

**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**BALGAM ÖRNEKLERİNDE MİKOBAKTERİLERİN ARANMASINDA
GENOTYPE MYCOBACTERİA DİRECT TEST YÖNTEMİNİN
KLASİK TANI YÖNTEMLERİYLE KARŞILAŞTIRILMASI, İZOLE
EDİLEN *M. tuberculosis complex*' DE İZONİAZİD VE RİFAMPİSİN
DİRENCİNİN ARANMASI**

Dr.İmran SAĞLIK

**Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**ESKİŞEHİR
2007**

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**BALGAM ÖRNEKLERİNDE MİKOBAKTERİLERİN ARANMASINDA
GENOTYPE MYCOBACTERİA DİRECT TEST YÖNTEMİNİN
KLASİK TANI YÖNTEMLERİYLE KARŞILAŞTIRILMASI, İZOLE
EDİLEN *M. tuberculosis complex*' DE İZONİAZİD VE RİFAMPİSİN
DİRENCİNİN ARANMASI**

Dr.İmran SAĞLIK

**Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr.Nuri KİRAZ**

**ESKİŞEHİR
2007**

TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren sayın hocalarım Prof.Dr. Yurdanur AKGÜN'e, Prof.Dr. Filiz AKŐİT'e, tez danışmanım Prof.Dr. Nuri KİRAZ'a, Prof.Dr. Tercan US'a, Prof.Dr. Gül DURMAZ'a, Yard.Doç.Dr.Nihal DOĞAN'a, Yard.Doç.Dr.Abdurrahman KİREMİTÇİ'ye, Uzm.Dr.Nilgün KAŐİFOĐLU'na; Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlileri Dr.Buket YAYLA'ya, Dr.Arzu ARGUN TÜKKAN'a, Dr.Aőkın D. AYBEY'e, Dr.Esin ÇETİN'e, Dr. Münire PINARBAŐLI'ya, Dr. Özlem SANCI'ya ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarının tüm çalışanlarına; ayrıca örneklerin toplanması aşamasında bana yardımcı olan Taksim Verem Savaş Dispanseri sorumlu hekimi Uzm.Dr.Engin SEBER'e yardımları ve destekleri için teşekkür ederim. Eğitim ve öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi olarak varlıklarını her zaman yanımda hissettiğim aileme sonsuz sevgi ve Őükranlarımı sunarım.

ÖZET

Sağlık İ. Balgam Örneklerinde Mikobakterilerin Aranmasında GenoType Mycobacteria Direct Test Yönteminin Klasik Tanı Yöntemleriyle Karşılaştırılması, İzole Edilen *M. tuberculosis complex*'de İzoniazid ve Rifampisin Direncinin Aranması. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Tıpta Uzmanlık Tezi. Eskişehir 2007.

Tüberkülozun görülme sıklığında son yıllarda gözlenen artış, beraberinde çoklu ilaç direnci gösteren suşların da yaygınlaşmaları ve bunların önemli sağaltım problemlerine yol açmaları, etkenin erken tanısı yolundaki arayışları hızlandırmıştır. Mikobakteriyel enfeksiyonların laboratuvar tanısında direkt mikroskopik inceleme ve mikroorganizmanın kültürünün yapılması geleneksel yöntemler, GenoType Mycobacterium Direct test ve MTBDR ise moleküler yöntemlerdir. Çalışmamızda 64 balgam örneği; iki farklı direkt mikroskopi yöntemiyle (karbolfuksin ve floresan), iki farklı kültür yöntemiyle (LJ + Bactec 12B) ve GenoType Mycobacteria Direct Test yöntemleriyle incelendiler. Kültürde üreyen örneklerde Bactec 460 TB ve GenoType MTBDR ile İNH ve RİF direnci arandı. Çalışmaya alınan 64 örneğin alındığı hastaların 19'u kadın, 45'i erkekti. Bunların 48'i direkt mikroskopik inceleme ile pozitif olarak değerlendirildi. Bactec 12B'de 45 örnekte üreme saptanırken, LJ besiyerinde 41 örnekte üreme saptandı. GenoType Mycobacteria Direct testinde 50 örnek pozitif olarak değerlendirildi. Kültürde üreyen 45 örnekten 4'ünde RİF, 3'ünde İNH direnci saptandı.

BACTEC 460 TB sistemi ve LJ besiyeri kültür kombinasyonu altın standart kabul edilerek floresan boyamanın duyarlılığı %96, özgüllüğü %74, karbolfuksin boyamanın duyarlılığı %80, özgüllüğü %90, tedavi almayan hastalarda GenoType Mycobacteria Direct testinin duyarlılığı %97, özgüllüğü %100, tedavi alan hastalarda GenoType Mycobacteria Direct testinin duyarlılığı %100, özgüllüğü %14, GenoType MTBDR testinin RİF direnci için duyarlılığı %75, özgüllüğü %100, İNH direnci için duyarlılığı %60, özgüllüğü ise %100 olarak hesaplandı.

Uygulanan yöntemlerin değerlendirilmesi sonucunda GenoType Mycobacteria Direct'in ve GenoType MTBDR'nin tüberkülozun hızlı tanısında ve ilaç direncinin saptanmasında iyi bir potansiyele sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Balgam, Mycobacteria, tüberküloz, GenoType, direnç

ABSTRACT

Sağlık İ. Comparison of the Genotype Mycobacteria Direct Assay Method with the Conventional Identification Methods in the search of Mycobacteria in the sputum samples, search of izoniazid and rifampisin resistance in the *M. tuberculosis* complex isolated. Eskişehir Osmangazi University, Faculty of Medicine, Medical Speciality Thesis in Department of Microbiology, Eskişehir, 2007. The increase in prevalence of tuberculosis in recent years, wide spread of multidrug-resistant strains and important problems in treatment caused by them have accelerated the search in rapid diagnosis of the agent. Direct microscopy and culture of microorganism are conventional methods but GenoType Mycobacteria Direct test and MTBDR are molecular methods in laboratory diagnosis of mycobacteria infections. In our study, 64 sputum samples were investigated by two different direct microscopy method (carbolfuchsin and fluorescent), two different culture method (LJ + Bactec 12B) and GenoType Mycobacteria Direct test. INH and RIF resistance were searched by Bactec 460 TB in growth samples and by GenoType MTBDR. 19 of 64 patients were female and 45 were male. 48 samples were determined positive by direct microscopy. 45 samples were positive by Bactec 12B, 41 samples were positive by LJ. 50 samples were positive by GenoType Mycobacteria Direct test. RIF resistance was detected in 4 and INH resistance was detected in 3 of 45 samples which were positive by culture.

When we considered the culture combination of Bactec 460 TB system and LJ medium as gold standart, the sensitivity of fluorescent staining was 96%, and the specificity was 74%, the sensitivity of carbolfuchsin staining was 80%, and the specificity was 90%. The sensitivity and specificity of GenoType Mycobacteria Direct test, in non-treated patients were 97% and 100%, respectively. In treated-patients the sensitivity and specificity of this test were 100% and 14%, respectively. The sensitivity of GenoType MTBDR test for RIF resistance was 75% and the specificity was 100%. The sensitivity for INH resistance was 60% and the specificity was 100%. After evaluation of these methods, we concluded that GenoType Mycobacteria Direct and GenoType MTBDR have potential in rapid diagnosis of tuberculosis and determining drug resistance.

Key words: Sputum, Mycobacteria, tuberculosis, GenoType, resistance

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİLLER.....	ix
TABLolar.....	x
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Tarihçe.....	3
2.2.Epidemiyoloji.....	4
2.3.Mikrobiyoloji.....	6
2.3.1.Taksonomi.....	6
2.3.2.Morfoloji.....	8
2.3.3.Bulaşıcılık.....	10
2.3.4.Patogenez.....	12
2.4. Tanı Yöntemleri.....	15
2.4.1.Direkt Mikroskopik İnceleme.....	17
2.4.2.Kültür.....	19
2.4.3.Serolojik Tanı Yöntemleri.....	23
2.4.4.Moleküler Tanı Yöntemleri.....	24
2.4.5.Antitüberküloz Tedavi.....	27
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
3.1. Direkt Mikroskopik İnceleme.....	31
3.2. Kültür.....	34
4.BULGULAR.....	49
5. TARTIŞMA.....	58
6.SONUÇ.....	63
KAYNAKLAR.....	65

SİMGELER VE KISALTMALAR

DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
LJ	Löwenstein Jensen
MTBDR	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Drug Resistance
INH	izoniazid
RIF	rifampisin
DGTS	Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi
EZN	Ehrlich-Ziehl-Neelsen
IFN- γ	İnterferon gama
TNF	Tümör nekrosis faktör
MCP-1	monosit kemotaksik protein
NALC	N-Asetil-L-Sistein
NaOH	Sodyum hidroksit
CDC	Centers for Disease Control
MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
MOTT	tüberküloz dışı mikobakteriler
GI	üreme indeksi
MGIT	Mycobacterium Growth Indicator Tube
PPD	pürifiye protein derivelerinin
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
PCR	polimeraz chain reaction
FDA	food and drug administration
SDA	strand displacement amplification
LCR	ligaz chain reaction
NASBA	Nükleik asit dizi bazlı amplifikasyon
ÇİD	Çoğul ilaca dirençli
PPD	pozitif prediktif değerlerini
NPD	negatif prediktif değerlerini

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 3.1: Strip üzerinde bulunan prob bölgeleri	43
Şekil 3.2: Vahşi tip ve mutant gen bölgesine ait prob bölgeleri	47
Şekil 4.1: Çalışmamızdaki 6 örneğin GenoType MTBDR test sonuçları	57

TABLULAR

	Sayfa
Tablo 2.1: İnsanda İzole Edilmiş Mikobakteri Türlerinden Başlıca Patojenler	7
Tablo 2.2: Karbolfuksin ve Florokrom boyanmış yaymaların değerlendirilmesi	19
Tablo 4.1: Çalışılan tüm örneklerin yöntemlere göre test sonuçları	50
Tablo 4.2: Floresan boyamaya göre karbolfuksin boyamanın değerlendirilmesi	52
Tablo 4.3: Kültür ile floresan boyama yönteminin karşılaştırılması	52
Tablo 4.4: Kültür ile karbolfuksin boyama yönteminin karşılaştırılması	53
Tablo 4.5: Direkt mikroskopik inceleme ve MTBD test sonuçları	53
Tablo 4.6: Bactec 12B ve LJ besiyerlerinde üremelerin değerlendirilmesi	54
Tablo 4.7: Tedavi almayan hastaların testlere göre dağılımı	55
Tablo 4.8: Tedavi alan hastaların testlere göre dağılımı	55
Tablo 4.9: İNH ve RİF direncinin örneklerle göre dağılımı	56
Tablo 4.10: Üreyen örneklerde saptanan direncin dağılımı	56
Tablo 4.11: Direnç saptamada kullanılan iki yöntemin ilaçlara göre dağılımı	57

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Tüberküloz, %97-99 oranında *M.tuberculosis*'in neden olduğu, değişik klinik görünümlere sahip, kronik, nekrotizan bir enfeksiyon hastalığıdır. Bununla birlikte en sık görülen klinik tablo basilin akciğerlere yerleşmesine bağlı gelişen akciğer tüberkülozudur. (1)

Eski çağlarda olduğu gibi günümüzde de tüberküloz önemli bir halk sağlığı sorunudur. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre her yıl ortalama 8 milyon yeni tüberküloz olgusu bildirilmekte ve 3 milyon insan tüberküloz nedeniyle ölmektedir. Tedavi görmemiş pulmoner tüberkülozlu her hasta, yılda 10-15 insana hastalığı aktararak tüberküloz tehdidini körüklemektedir. Bu da tüberkülozu ölüme neden olan başlıca enfeksiyon hastalığı yapmaktadır.(2,3)

Tüberkülozdan korunmanın en etkin yolu hastalığın erken tanınması ve tedavi edilmesidir. Ön tanı klinik verilere dayanmakla birlikte, kesin tanı laboratuvar yöntemleriyle konulmaktadır. Duyarlılığın belirlenmesi de tedavinin yönlendirilmesi açısından oldukça önemlidir.(4)

Son yıllarda tüberküloz insidansının ve ilaçlara dirençli basillerle oluşan hastalığın artması, tanı için duyarlı ve hızlı sonuç veren yöntemlerin aranmasını gerektirmiştir. (5)

Çalışmamızda enfekte hastalardan alınan balgam örneklerini iki farklı yöntemle (karbolfüksin ve florokrom) boyayarak direkt mikroskopik incelemeyle ve moleküler bir yöntem olan GenoType Mycobacteria Direct Test ile bakteri varlığını erken dönemde saptamayı planladık. Bactec TB 460 ve Löwenstein Jensen (LJ) besiyerlerine ekim yaparak üremelerini değerlendirmeyi ve hızlı tanı koymada uyguladığımız testlerin etkinliğini değerlendirmeyi amaçladık.

Tüberküloz tedavisinde en önemli ilaçlardan olan izoniazid ve rifampisin direnci, tedavinin seyrini ciddi şekilde etkilemektedir. Çalışmamızda üreme saptanan örneklerde *M. tuberculosis* complex varlığı ile izoniazid ve rifampisin direncini eş zamanlı olarak 4-5 saatte saptayan moleküler bir yöntem olan GenoType *Mycobacterium tuberculosis* Drug Resistance (MTBDR) uyguladık. Ayrıca aynı örnekleri Bactec TB 460'nin bir parçası olan NAP testi ile tanımlama ve aynı sistemle izoniazid ve rifampisin direncini saptama uygulanarak bu testlerin tanımlama ve direnç varlığını saptamadaki etkinliğini araştırmayı hedefledik.

Dirençli suşlarla enfekte bireylerde tanının gecikmesi ve tedavi başarısızlığı mortalite ve morbiditeyi arttırmakla birlikte hastalığın yayılmasına da sebep olmaktadır. Kültürün tanıda altın standart olmasıyla birlikte tür ayırımında kullanılan biyokimyasal testlerin zaman alıcı olması nedeniyle moleküler yöntemler etken bakterinin hızlı tanımlanmasında ve direnç varlığının erken dönemde saptanmasında, buna bağlı olarak da uygun tedavi protokolünün erken dönemde belirlenmesinde yararlı olabilirler. Bu sayede tedavideki bazı aksaklıkların belli ölçüde engellenebileceği düşünülmektedir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Tarihçe

Tüberküloz insanlık tarihinin en eski hastalıklarından biridir. Milattan 5000 yıl öncesine ait mumyalarda kemik tüberkülozunu düşündüren bulgular vardır.(6) Hippocrates'in hastalık için "phthisis" (erime) terimini kullandığı bilinmekte ve tüberkülozun semptomatolojisi hakkında geniş bilgiye sahip olduğu düşünülmektedir. (7)

Tüberküloz tarihinin en önemli dönüm noktası, Robert Koch'un 1882'de tüberkülozun, *Mycobacterium tuberculosis* tarafından oluşturulan bir infeksiyon hastalığı olduğunu kanıtlaması ile gerçekleşmiştir. (7)

Tüberküloz, endüstri devrimine kadar sporadik görülen önemsiz bir hastalık olarak sürmüştür. İngiltere'de 16. yüzyıl sonları ve 17. yüzyılda tüberküloz olgularında büyük artışlar gözlenmiş ve o dönemdeki ölümlerin dörtte birinden sorumlu tutulmuştur. Avrupalıların siyasi ve ticari amaçlı gezileri tüberkülozun dünyaya yayılmasına neden olmuştur. (8)

1900'lü yılların başında hastaların sanatoryumlarda izolasyonu ve sosyo-ekonomik koşulların iyileştirilmesi ile kemoterapi öncesi dönemde her yıl ölümlerde %5-6 azalma sağlanabilmiştir. 1950'lerde kemoterapinin tedaviye girişi ile bu azalma %10-14'lere ulaşmıştır. 1970'lerde gelişmiş ülkelerde hastalığın eradikasyonu beklenirken, 1985'ten itibaren bu ülkelerde tüberküloz insidansinin tekrar artmaya başladığı görülmüştür.(9)

1950'li yıllarda bulunan ilaçlarla hastalık 18-24 ayda %100 tedavi edilebilir hale gelmiş, günümüzde etkin tedavi rejimleri ile bu süre 6 aya kadar indirilmiştir. Son yıllarda sürdürülen çalışmalarla yeni tanı yöntemleri bulunması ve geliştirilmesi konusunda önemli gelişmeler sağlanmıştır. (10)

1950'nin başlarında izoniazid (INH) ve izleyen yıllarda pirazinamid (PZA), tiasetazon, etionamid, protionamid ve etambutol (EMB) bulunmuştur. Bu keşifler sanatoryumların sonunu getirmiş ve tedaviler ayaktan yapılmaya başlanmıştır. Türkiye'de de 1970'li yıllardan itibaren aynı süreç yaşanmıştır. Kemoterapideki son devrim 1966'da rifampisin (RIF) kullanıma girmesi olmuştur. Bu keşif şu anda da uygulanmakta olan kısa süreli tedavinin yolunu açmıştır.(8,11) Yirminci yüzyılın ikinci yarısında tüberküloz savaşında kazanılan bu zaferler, gelişmiş ülkelerde hastalığın sürekli bir gerileme dönemine girmesini sağlamıştır. Ancak 1985 yılında

evsizlik ve HIV/AIDS birlikteliğinde yeniden, üstelik çok ilaca dirençli olan ciddi olgular şeklinde tekrar karşımıza çıkmaya başlamıştır. (12)

2.2.Epidemiyoloji

Tüberküloz insidansı sosyoekonomik özelliklere bağlı olarak ülkeden ülkeye değişmektedir. Gelişmiş ülkelerde tüberküloz insidansının çok düşük olmasına karşın, geri kalmış ve gelişmekte olan ülkelerde hız çok yüksektir. Hindistan'da tüberküloz insidansı 100.000 kişide 450'den daha fazla tahmin edilmekte(13) iken İngiltere'de bu rakam 12.2/100.000, Hollanda'da ve Avusturalya'da yaklaşık 5/100.000'tir.(14)

Gelişmiş ülkelerde tüberküloz daha çok yaşlılarda görülür, gelişmemiş ülkelerde ise durum tam tersidir. Göçmenler, diabet, alkolizm, bakım evlerinde yaşayanlar, immün supresif tedavi alanlar ve AIDS gibi risk faktörleri ile insidans artmaktadır. (12,14)

1950'li yıllarda tüberküloz yurdumuzda birinci derece ölüm nedeni iken, yapılan mücadele sonucu günümüzde ölüm nedenleri sırasında daha alt sıralarda yer almaktadır. (Istanbul Verem Savas Dispanseri, 1984-1985 yılları çalışma raporu) 1950 yılında %0.25 oranında olan aktif tüberküloz sıklığı 1976'ya kadar %0.1'e inmiştir.(15) 1981- 1982 yılında 80000 kişiyi kapsayan bir araştırmada aktif tüberküloz riski %0.36 bulunmuştur. (16)

Yıllar içinde tüberkülozla mücadelede önemli ilerlemeler kaydedilmiş olmakla birlikte, Türkiye halen orta insidansa sahip ülkeler arasında yer almaktadır. Bir yanda yıllık tüberküloz insidansı 100/100000'ün üzerinde olan Eski Sovyetler Birliği, Orta Asya, ve Güney Afrika ülkeleri diğer yanda insidansın 10/100000'un altında olduğu Batı Avrupa ülkeleri yer almaktadır. 2005 Dünya Sağlık Örgütü kayıtlarına göre Türkiye'de 2003 yılı için tahmin edilen insidans 26/100000 olarak belirtilmiştir. (17)

Yüksek tüberküloz insidansına ilave olarak, antitüberküloz ilaçlara direnç oranları da oldukça dikkat çekici boyutlardadır. Ulusal direnç durumunu yansıtacak veri olmamakla birlikte, farklı illerden yapılan çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde başlangıç ve kazanılmış çoğul ilaca direnç oranlarının sırasıyla %1.3-4.8 ve %4.4-16.6 arasında değiştiği görülmektedir. En az bir ilaca karşı primer

ve sekonder direnç oranları ise sırasıyla %18-26.6 ve %28-53.4 arasında değişmektedir.(18-20)

Yüksek insidans yanında primer ilaç direncinin de yüksek olması ülkemizdeki bulaş oranının yüksekliğini ve tüberküloz kontrol önlemlerinin yetersizliğini göstermektedir. Tüberküloz insidansını gelişmiş ülkelerdeki seviyeye düşürmede erken tanı, doğru tedavi ve etkin korunma-kontrol önlemlerinin önemi açıktır. (18)

Son 10 yılda dünyada tüberküloz konusunda önemli gelişmeler olmuştur. Tüberkülozlu hastaların sayıları ve ölümlerinin durumu 10 yıl önce önemli bir yazı ile gündeme gelmiştir.(21) Bu yazıda, dünya nüfusunun üçte birinin tüberküloz basili ile enfekte olduğu belirtilmiş, tüberküloza bağlı yıllık hastalanma ve ölümlerin tahmini rakamları ortaya konulmuştur. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) öncülüğünde 1991'den bu yana yeni bir tüberküloz kontrol stratejisi hızla yayılmış ve günümüzde hastalığın kontrolünün temel yöntemi olarak kabul görür hale gelmiştir. Bu strateji, Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisidir (DGTS). (22)

DGTS stratejisi:

1. TB kontrolü ile ilgili uygulamalar için politik iradenin ortaya konması,
2. Semptomatik hastalarda bakteriyolojik tanı,
3. Gözetimli kısa süreli tedavi,
4. Ücretsiz ve sürekli ilaç sağlanması ve
5. Kayıt-raporlama-analiz sistematığının kurulması, unsurlarını içermektedir.

Dünyada tüberküloz artışında dört önemli unsur sıralanmıştır: (a) hükümetlerin hastalığı ihmal etmeleri sonucunda kontrol sistemleri kötüleşmiş ve hatta birçok yerde kaybolmuştur; (b) kötü yönetilen ya da doğru yaklaşımların uygulanmadığı kontrol programları hastalığın artışı yanında ilaca dirençli tüberkülozun artışına yol açmıştır; (c) Tüberküloz ve HIV'nin birlikte olduğu hallerde, HIV'in endemik olduğu yerlerde tüberküloz çok büyük artış yapmıştır; (d) Nüfus artışı olguların sayılarında artışa yol açmıştır. (23)

Sanayileşmiş ülkelerde ise göçlerle gelen tüberküloz olguları, o ülkelerde artış nedenlerinden birisini oluşturmaktadır. (24,25)

Tüberküloz hasta sayılarındaki artışlar ve tüberküloz kontrolü çabalarının yeterince başarı sağlayamaması nedeniyle, DSÖ, 1993 yılında tüberküloz için acil

durum ilan etmiştir. Dünyada bir hastalık için ilk kez acil durum ilan edildiği bilinmektedir. 1994 yılında da tüberküloz savaşının yeni doğrultusunu ortaya konmuş böylece 1990'lı yıllarda başlayan DGTS stratejisi uygulamaları, dünyada hızlı bir şekilde yayılmıştır. (23)

Dünyadaki tüberküloz hastalarının %80'ini kapsayan, en çok hastanın olduğu ülkeler yüksek hasta yükü olan ülkeler olarak ele alınmaktadır. Bunlardan en çok hastanın bulunduğu beş ülke Hindistan, Çin, Bangladeş, Filipinler ve Güney Afrika'dır. (26)

Tüberkülozun önlenememesindeki nedenler şöyle sıralanabilir:

- Toplum sağlığı ile ilgili altyapı sistemlerindeki yetersizlikler
- Göçler
- HIV epidemisi
- Hastaları takip ve değerlendirmede yetersizlik
- Yetersiz izolasyon işlemleri
- Laboratuvar imkanlarının sınırlı olması
- Tanı ve etkin tedavinin başlamasında gecikme
- Kalifiye eleman yetersizliği
- Anti-tüberküloz ilaçlara direnç.(27)

2.3.Mikrobiyoloji

2.3.1.Taksonomi

Mycobacterium'lar Mycobacteriaceae ailesindeki tek cinstir. Mycobacterium cinsi bakterilerin temel özellikleri yavaş üremeleri, aside dirençli olmaları, hücre duvarlarında bol miktarda lipid içermeleri ve genomlarında %59-65 GC içermeleridir. *M. tuberculosis* dışında 70'in üzerinde tür tanımlanmıştır. Bunların içinde major 2 patojen: *M. tuberculosis* (Koch, 1882), *M. leprae*'dir. (Hansen, 1874) (28)

Bakteriyolojik özellikleri ve DNA benzerlikleri nedeniyle birbirleriyle yakın ilişkili türler, "complex" başlığı altında toplanmaktadırlar. "*M. tuberculosis complex*" *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M.microti*, *M.africanum* ve *M. bovis BCG*'yi içermektedir. Klinik açıdan bakıldığında hastalık yapma potansiyeli ve halk sağlığı ile yakın ilişkisi nedeniyle *M. tuberculosis* cinsin en önemli üyesidir ve günümüzde

insanlarda görülen tüberkülozun esas nedenidir. Çok az sayıda (%1-2) olguda *M. bovis* ve *M. africanum* etken olarak saptanır. *M. microtti* ise kemiriciler için patojen olup insanlarda hastalık yapmaz. (29)

M.tuberculosis kompleks dışındaki mikobakterilere "tüberküloz dışı mikobakteriler" veya "atipik mikobakteriler" denmektedir. Bunlar doğada, toprakta, suda bolca bulunurlar, insandan insana geçişi çok enderdir ve çoğu patojen değildir. Bu grubun üyeleri ender olarak hastalık oluştururlar. (29)

İnsanda hastalık yapan mikobakteriler ve bunların patojenite özellikleri tablo 1'de gösterilmiştir. Ernest Runyon'un, mikobakterileri üreme hızları ve katı besiyerinde oluşturdukları koloni özelliklerine göre 4 ana grupta sınıflandırdığı bilinmektedir. (30,31)

Tablo 2.1: İnsanda İzole Edilmiş Mikobakteri Türlerinden Başlıca Patojenler. (30)

Grup	Zorunlu Patojen	Fakültatif Patojen	Potansiyel Patojen
Kesin Patojenler	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. africanum</i> <i>M. leprae</i>	<i>M. bovis</i>	
Fotokromojenler (Runyon I)		<i>M. kansasii</i> <i>M. asiaticum</i> <i>M. marinum</i> <i>M. simiae</i>	
Skotokromojenler (Runyon II)		<i>M. scrofulaceum</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. xenopi</i>	<i>M. gordonae</i> <i>M. flavescens</i>
Nonkromojenler (Runyon III)	<i>M. genavense</i>	<i>M. avium</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. shimoidei</i>	<i>M. gastri</i> <i>M. terrae</i> <i>M. triviale</i>
Hızlı Üreyenler (Runyon IV)		<i>M. chelonae</i> <i>M. fortuitum</i>	<i>M. fallax</i> <i>M. smegmatis</i>

Moleküler idantifikasyon yöntemlerinin yaygınlaşmasıyla, türler arası benzerlikler ve farklılıklar daha spesifik olarak saptanmaktadır. (30)

2.3.2.Morfoloji

Mycobacterium'lar 0.2-0.6 µm eninde, 1-10 µm boyunda, ince uzun, düz veya hafif kıvrık basillerdir. Klinik örnekten hazırlanan preparatlarda tek tek, kısa zincirler yapacak şekilde uç uca veya dallanma göstererek durabilirler. Middlebrook 7H9 gibi özel sıvı besiyerlerinde kord oluşturmaları söz konusudur. Besiyerinde oluşturdukları kolonilerden yapılan preparatlarda ise gruplar şeklinde görülürler. İçerdikleri polimetafosfat granüllerine bağlı olarak basil, kendisinden daha koyu boyanmış boncuklu veya ince bantlar içeren şekillerde de görülebilir ve spor, kapsül, flagel veya miçelleri bulunmaz. (29,30)

Mikobakteriler aerop veya mikroaerofildirler. % 5-10 CO₂'li ortamda üremeleri hızlandırılabilir. Tipik suşların replikasyon zamanı 15-20 saattir. *M. tuberculosis*'in optimal üreme ısısı 37°C'dir. (7)

Mikobakteriler karmaşık bir yapı gösterirler. Bu bakteriler bir plazma zarı ile sınırlanan stoplazma ve bunları çevreleyen lipitden zengin bir hücre duvarına sahiptir. Yapılarında bol miktarda bulunan lipofilik makromoleküller biyolojik aktiviteye sahiptir. Diğer bakterilerin hücre duvarı ile karşılaştırıldığında mikobakteri hücre duvarı oldukça kalındır ve lipofilik özellik gösterir. Bu yapı, aside dayanıklılık, bakteri hücresinin bir araya toplanması, konak hücreleri tarafından salınan eritici enzimlere ve bakterisidal ilaçlara direnç yanı sıra, olasılıkla bazı besinlerin, hatta antibiyotiklerin hücreye girmesine engel olma gibi bir çok özellik kazandırır.(32)

Mikobakterilerin hücre duvarı tabakalardan oluşmuştur. Plazma zarının üzerinde bulunan en iç tabaka peptidoglikandandır. Bu tabaka kısa peptid zincirleri, çapraz bağlarla sıkıca bağlanan uzun polisakkarit zincirleri içerir ve hücrenin sert yapısını sağlar. Peptidoglikan tabakasının üzerinde bulunan ikinci tabaka arabinogalaktan tabakası olup hücre duvarı kitlesinin %35'ini oluşturur ve peptidoglikan tabakasına fosfodiester köprüleriyle bağlıdır. Arabinogalaktanların zincirindeki uç arabinaz birimlerine mikolik asit diye adlandırılan, uzun zincirli

bir grup yağ asiti kovalent olarak bağlanırlar. Bu asitler hücre duvarı kalınlığından ve büyük oranda da hücrenin aside dirençli olmasından sorumludur. Mikolik asitler, trehaloz gibi bir şekere bağlanarak ip faktörü (cord factor) oluşturabilirler. Hücre duvarında bulunan ve duvar ağırlığının %60'ını yapan lipidlerin çoğu uzun zincirli yağ asitlerinden oluşmaktadır. Bu lipidler tüberkülostearik asit, mikoserik asit ve mikolik asitleri içerirler. (29,31)

Virulans ile ilgili olduğu bildirilen ip faktörüne sahip mikobakteriler aside dirençli boyalarla boyanmış preparatlarda çalı demeti görünümünde olmaları ile dikkati çekerler. Yine bu yapıda yer alan balmumuna bağlı protein yapısındaki maddelerin tüberkülin allerjisinde rolü olduğu gösterilmiştir. (33)

Mikobakteriler karbol fuksin gibi bir anilin boyası ile boyandıktan sonra asit ve alkol ile yapılan renk giderme işlemine dirençlidir ve bu nedenle asit ve alkole dirençli basil olarak adlandırılmaktadırlar. Bu özellik hücre duvarındaki (peptidoglikan ve arabinomannan)'in oluşturduğu ağ tabakası ile ilişkilidir. Anilin boyası bu tabaka ile bağ oluşturarak asit ve alkol etkisine karşın yerinde kalır. Bu yöntem son 60 yıldır kullanılan Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) tekniği ile klinik örneklerde aside dirençli basillerin saptanmasını sağlar.(31,33)

M. tuberculosis'in üremesi yavaş olup standart kültür ortamında üremesi ortalama 4-6 haftada gerçekleşir. Olumsuz koşullara oldukça dayanıklıdır ve uzun süre canlılığını sürdürebilir. Aerob olan bakteri +4°C'de haftalarca, -70°C'de yıllarca canlılığını koruyabilmesine karşın, 60°C'de 20 dakikada, 70°C'de 5 dakikada ölür. (34)

Mikobakteriler oldukça karmaşık tek hücreli organizmalar olarak antijenik özellikte pek çok protein, lipid ve polisakkarit içerirler. Antijenik yapıların sayısı tam olarak bilinmemektedir. Antijenik yapılar sitoplazmada (soluble) ve hücre duvarında lipidlere bağlı (insoluble) olarak bulunmaktadır. (34)

Mikobakteriyel antijenik yapıların bazıları immun sistemde baskılayıcı işlev görürken, diğerleri granulom oluşumuna yol açma, makrofajları aktive etme, konak toksisitesini oluşturma ve adjuvant aktivite gösterme gibi işlevlere sahiptir.(34)

Proteinler hücre kuru ağırlığının % 50'sini oluştururlar. Bu maddeler organizmada tüberkülin tipindeki aşırı duyarlılık tepkimelerinden sorumludurlar. Bal

mumu adjuvant etkisi ile bunların etkinliğini artırır. Mikobakteriyel proteinler genellikle hem hümmoral hem de hücreseel immun yanıtı ortaya çıkarırken, mikobakteriyel karbonhidratların hümmoral immün yanıt oluşturduğu bilinmektedir. (7,34)

Antijenik proteinler ve peptidler hücre duvarı ve sitoplazmada bulunmaktadırlar. Peptidler, hapten gibi davranabilir ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonuna neden olabilirler. Polisakkaridler mikobakterilerin önemli antijenik kısımlarını oluştururlar. Polisakkaridlerin temel kaynağı hücre duvarıdır. Mikobakteriyel lipidler sitoplazmada da bulunmalarına karşın en çok hücre duvarında yer alırlar. Mikolik asidler, fosfolipidler, Wax D, mikosidler ve diğer glikolipidlerin tümünün hastalıklardaki rolü ya konak toksisitesini oluşturmak ya da immunolojik aktivite olabilir. Wax D adjuvan etki göstermektedir. (7,34)

2.3.3.Bulaşıcılık

Tüberküloz basilleri insan vücuduna çok değişik bölgelerden (solunum, sindirim, deri ve konjunktiva) girebilir. Ancak en önemli bulaş yolu inhalasyondur. (33) Bunun sonucunda da en sık görülen şekil akciğer tüberkülozudur. En bulaştırıcı olan hastalar balgam mikroskopisinde ARB pozitif olan akciğer ve larinks tüberkülozlulardır. Yayma negatif tüberkülozlu hastaların bulaştırıcılığı çok daha azdır (35) Hasta ile yakın ve uzun süreli teması olan kişilere bulaşma riski fazladır. Bunlar, aile bireyleri, aynı evi paylaştığı arkadaşları, işyeri arkadaşları olabilir. Kaviteli hastalıkta, larinks tüberkülozunda, fazla öksürmekle, aksırıkla, öksürük yaratan işlemlerde TB hastası daha fazla basil saçır. Bazı suşların daha fazla bulaştırıcı olduğu gösterilmiştir. (36)

Çeşitli solunum manevralarının aerosol oluşturma potansiyeli farklıdır ve konuşma ile 0-210, öksürme ile 0 - 3.500 ve hapsirme ile 4.500 - 1.000.000 partikül oluştđu hesaplanmaktadır. Etkili tedavi ile ilk günlerde basil sayısı hızla azalmaktadır. Hastaların bulaştırıcılığı, etkili tedavi ile 2-3 haftada pratik olarak sona erer. Bu nedenle, hastayı hemen izole etmek ve etkili tedaviye başlamak önemlidir. (37)

Tüberküloz basilinin akciğgerlere yerleşip çoğalabilmesi için alveollere kadar ulaşması gerekmektedir. Bu da ancak hasta kişiden solunum ile havaya saçılan

damlacık çekirdeklerinde asılı halde bulunan basillerle mümkün olabilmektedir. Çapları yaklaşık 1-10 mikron olan partiküller alveollere ulaşır, fakat 1-3 mikron olanlar daha yüksek oranda ulaşır. Yaklaşık 1 mikron çaplı partiküller havada birkaç saat asılı kalabilmektedir. Yapılan deneysel araştırmalar, tüberküloz basilinin tozla, toprakla, hastaların eşyalarını kullanmakla ya da aynı kaptan yemekle bulaşamayacağını göstermiştir. İlaça-dirençli tüberküloz da bulaştırıcıdır. Birinci grup ilaçlarla yapılan tedavi etkisiz olursa, tedavi sürecinde de bulaştırıcılık devam edecektir .(37)

Akciğer dışı tüberküloz genellikle bulaştırıcı değildir, fakat otopside (38) ve doku ile (39) yapılan çalışmalarda aerosol oluşturulursa bulaşma görülebilmektedir.

Tüberkülozda Bulaşıcılığı Etkileyen Faktörler:

Kaynak hasta:

- * Balgamında basil sayısı (yayma pozitifliği)
- * Balgamın aerosol oluşturması (öksürük, hapşırık, sulu balgam)
- * Basilin canlılığı (antimikrobiyal ilaçlar)
- * Basilin virülansı

Ortam:

- * Havalandırma (havanın hacmi artınca basiller seyreltilir)
- * Havalandırma sisteminin aynı havayı tekrar vermesi
- * Ultraviyole, güneş ışığı
- * Kaynağa yakın olma (aile bireylerinde enfeksiyon ve hastalık daha fazladır)

Hedef kişi:

- *Hastalığa/basile dirençlilik (önceki hastalık, koruyucu tedavi, BCG, TB dışı mikobakteri enfeksiyonları)
- * Hastalanmayı artıran durumlar ve diğer hastalıklar
- * Basil kaynağı ile birlikte geçirilen süre

Maruziyet:

- * Toplumda bulaştırıcı hasta sayısı
- * Kaynak kişinin bulaştırıcılığı (öksürük, aksırık, şarkı söyleme ile artar; basilin yoğunluğunu azaltan havalandırma, UV uygulama, güneş gibi faktörlerle azalır)
- * Bulaştırıcı kişi ile temas derecesi (yakında ise, temasın süresi uzun ise artar). (36)

3.3.4. Patogenez

Basil, inhalasyondan sonra 1-5 µm çapındaki damlacıklarla bronşial ağaçtan taşınarak bir respiratuvar bronşiole veya alveollere yerleşir. Basilin akciğerde enfeksiyon oluşturup oluşturumaması bakterinin virulansına, inhale edilen bakteri miktarına, onu sindiren alveoler makrofajın mikrobisit özelliğine bağlıdır. (40).

Basilin ilk inhalasyonundan sonra enfeksiyon oluşumu ve bundan sonraki dönemde hastalık gelişimi olmak üzere iki aşamalı bir sürece sahiptir. Alveollere ulaşan basil buradaki makrofajlar tarafından fagosite edilir. Burada bakterinin virulansını belirleyen başlıca özellik, monositler ve makrofajlar içinde üreyebilmesidir. (33)

Bulaşıcı nitelikteki bir akciğer tüberkülozlu hasta ile (yayma pozitif) karşılaşan tüberkülin deri testi negatif temashların yaklaşık %30'unda tüberküloz enfeksiyonu oluşur ve bu kişilerde gerek klinik gerekse radyolojik hiç bir belirti olmaksızın tüberkülin deri testi pozitifleşir. Enfekte olan bu kişilerin %5'inde enfeksiyonu izleyen 5 yıl içinde hastalık gelişir (primer tüberküloz). Primer enfeksiyonu izleyen uzun bir latent dönemden sonra (en az 5 yıl sonra) enfekte kişilerin %5'inde hastalık gelişmektedir (sekonder tüberküloz). (36,41)

Tüberkülozda, canlı bir tüberküloz basilinın alveole yerleşmesinden kaviter akciğer tüberkülozu gelişimine kadar geçen olaylar, basil ile konak arasındaki bir seri "savaş" sonucu olur. Konak tarafından oluşturulan hücrel immünite ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonları tüberküloz patogenezinde belirleyici rolü oynarlar. Bu immün yanıtlar oluşuncaya kadar tüberküloz basilinın kendisi konakçı dokularında hiç bir hasar oluşturamaz. Basil çoğalması ile konağın oluşturduğu immünolojik yanıtlar arasındaki etkileşim hastalığın hem ilerlemesini veya gerilemesini hem de gelişecek olan hastalığın tipini belirler.(42)

Tüberkülozda hücrel immünite konağın yararlı bir yanıtı olarak değerlendirilebilir ve bu yanıt tüberküloz basil antijenlerine özgü T lenfosit popülasyonunun klonal büyümesi ve makrofaj aktivasyonu ile karakterizedir. Basil antijenlerinin varlığında bu lenfositler aktive olmakta ve monositleri lezyon bölgesine çekerek aktive eden bazı sitokinler üretilmektedir. İnterferon gama (IFN-γ) ve Tümör nekrosis faktör (TNF) en güçlü makrofaj aktive eden sitokinlerdir.

Aktive olan makrofajlar reaktif oksijen ve nitrojen ürünleri, lizozomal enzimler ve diğer faktörleri üreterek mikrobisidal gücü arttırmaktadırlar. Böylece içlerinde çoğalmakta olan basilleri sindirebilir hale gelmektedirler.(42)

Tüberkülozdaki geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonu, içinde tüberküloz basilleri çoğalan inaktive makrofajları ve bu arada komşu dokuları harap eden süreç olarak tanımlanabilir. Geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonu, aslında hızlandırılmış bir inflamatuvar yanıttır ve özellikle yerel tüberkülin benzeri antijenlerin yüksek olduğu koşullarda konak dokularında sıklıkla hasara neden olur. Konağın bu yanıtı hem kazeöz nekroz hem de erime (likefaksiyon) ve kavite oluşumuna neden olur. O nedenle, klinik tüberküloz oluşumunda gözlenen akciğer hasarı tümüyle konağın geç tip aşırı duyarlılık yanıtıyla ilgilidir. (42)

Konak tarafından oluşturulan hem hücrel immün yanıt hem de geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonu yanıtları tüberküloz basillerinin çoğalmasını eşit düzeyde inhibe ederler. Hücrel immün yanıt bunu, fagosite ettikleri basilleri öldürmeleri için makrofajları aktive ederek yaparken, geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonu ise basil yüklü aktive olmamış makrofajları ve komşu dokuları harap edip, basillerin üremesi için uygun hücre içi ortamını yok ederek sağlar. Geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonu ile oluşturulan yerel nekroz hücrel immünite ile oluşacak yanıt için zaman kazandırır. (42)

Akciğer tüberkülozunda, basilin alveollere girişinden kavite oluşumuna dek olan aşamalar beş evrede özetlenebilir:(43)

Başlangıç Evresi: Basilin alveole inhalasyonu ile başlar ve bir hafta sürer. Alveoler makrofajlar lezyon bölgesinde toplanarak basilleri fagosite ederler ve %90'ını tahrip ederler. Bu ilk karşılaşmanın sonucu makrofajların gücüne ve basilin virulansına bağlıdır. Zayıf bir makrofaj içinde basil çoğalma imkanı bularak infeksiyonu başlatabilecektir. Basiller çoğalmaya başladıktan sonraki gelişmeler kandan gelecek makrofajlar tarafından belirlenir.(43)

İkinci Evre: Ortak yaşam ve logaritmik çoğalma evresidir. Alveoler makrofajların içindeki basilleri öldürememeleri halinde basiller hücre içinde çoğalır ve hücreyi parçalayarak alveoler boşluğa dağılırlar. Basiller, hücrel artıklar ve komplemanlar, sitokinler ve monosit kemotaksik protein (MCP-1) gibi birçok kemotaksik faktör dolaşımdaki inaktive monositleri lezyon bölgesine toplar ve bu

yeni makrofajlar basillerin etrafında toplanarak granülom oluşumunu başlatırlar. Bu ilk odak Ghon Odağı adını alır.(43)

Lezyon bölgesine gelen yeni makrofajlar basilleri fagosite ederler ancak aktive olmadıklarından basiller makrofajlar içinde logaritmik olarak çoğalmaya devam ederler. Basil yüklü makrofajlar lenfatiklerle bölgesel lenf nodlarına taşınırlar. Basiller burada da kontrol altına alınamazlarsa hematojen yolla tüm vücuda yayılırlar (lenfohematojen yayılım). Fakat sıklıkla oksijen basıncının yüksek olduğu lenf bezleri, böbrek korteksi, vertebral kolon, uzun kemiklerin epifizleri, meninksler ve özellikle de akciğer apeksleri gibi bölgelere yerleşirler ve buralarda granülomlar oluştururlar. Konakçının özgün olmayan savunması bu çoğalmayı engelleyemez. Ghon odağı ile komşu lenf bezlerinde gelişen lezyon birlikte primer kompleks olarak tanımlanır. (40)

Üçüncü Evre: İmmün yanıt gelişimi ve enfeksiyonun kontrol evresidir. Basilin inhalasyonundan sonraki 2.-3. haftalarda hem geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonu, hem de hücresele immün yanıt gelişmektedir, ancak hücresele immün yanıt lezyon bölgesindeki çok sayıdaki basili yok etmeye yetmez. Geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonu yanıtı inaktif makrofajları ve bu arada çevre dokuları harap ederek hücre içinde logaritmik olarak çoğalan basilleri durdurur. Konakçının bu yanıtı granülomların (tüberküllerin) merkezinde kazeöz nekroz oluşumuna yol açar. Hücre içinde çoğalan basillerden kaynaklanan tüberkülin benzeri proteinler, doku hasarlayıcı yanıtın oluşmasında önemli bir uyarandır. Aynı dönemde konakçının tüberkülin deri testi de pozitifleşir (primer enfeksiyon). (43)

Oluşan kazeöz nekroz ortamında anoksik koşullar, düşük pH, toksik yağ asitlerinin varlığı ve bilinmeyen nedenlerle basiller artık çoğalamazlar. Kazeöz dokularda basillerin bir kısmı ölürken bir kısmı da canlı fakat çoğalmaksızın yıllarca uyur halde kalırlar(dormant basiller). (42)

Dördüncü Evre: Geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonu ve de hücresele immün yanıt arasındaki etkileşim evresidir. Bağışıklık sisteminin yeterli olduğu kişilerde kazeöz odaklardan kaçan basiller makrofajlarla tutularak yok edilirler. Sonuçta az hasarla veya hiç doku hasarı olmadan basil çoğalması durdurulabilecektir. İmmün sistemi yeterli kişilerde de hücresele immün yanıt / geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonu oranı daha büyüktür ve kazeöz odaktan kaçan basiller hızla yok edilir. Yani bu

kişilerde kazeöz odak erimezse süreç durdurulmuş olur. Eğer basiller bu makrofajlarda da çoğalmayı başarırlarsa geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonu yanıtı tekrarlanır ve nekroz genişler. İmmün sistemi zayıf kişilerde kazeöz nekroz daha büyük ve daha şiddetli olmaktadır. Eğer immün yanıt yetersiz ise kazeöz nekrozlar genişler, akciğer dokusu harap edilir ve klinik tüberküloz tablosu ortaya çıkar.(43)

Gelişmesi durdurulan granülomun çevresi fibröz doku ile sarılır, kazeöz odak koyulaşır ve süreç genellikle yaşam boyu durdurulur. Çapı 0.1-1.3 mm olan kazeöz odaklar makrofajlarca temizlenirken 2-8 mm çapında olanlar hidrolitik enzimlerle eritilir ve geride fibröz doku oluşur. Çapı 5-20 mm olanlar ise fibröz kapsülle çevrilerek izole edilir (tüberküloma). Bu lezyonların iyileşme sürecinde kalsifikasyon da gelişebilir. Sonuçta primer enfeksiyon adı verilen bu süreç durdurulmakta ve geride tüberkülün deri testinin pozitifleşmesi dışında hiçbir kanıt kalmamaktadır.(42,43)

Beşinci Evre: Erime ve kavite oluşumu ile karakterizedir. Bu evre genellikle primer enfeksiyon veya hastalık sonrası endojen reaktivasyon ya da eksojen reenfeksiyon sonrası gelişen yetişkin tip akciğer tüberkülozunda görülmektedir. Nadiren primer tüberkülozda da kavite oluşabilir. Nedeni tam bilinmese de lezyon bölgesine gelen makrofajlardan salınan hidrolitik enzimlerin etkisiyle, geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonunun gelişiminin sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Kavite oluşumu hem kişinin hastalığının yayılmasına hem de hastanın bulaştırıcı özellik kazanmasına neden olur. (42)

Tüberkülozda gözlenen patolojik değişimler büyük oranda yerel basil antijen konsantrasyonuna ve aşırı duyarlılık reaksiyonunun derecesine bağlıdır. Yerel antijen yükünün ya da doku hasarlayıcı immün yanıtın fazla olduğu durumlarda eksüdatif lezyonlar, antijen yükünün ve doku hasarlayıcı yanıtın az olduğu durumlarda proliferatif lezyonlar ortaya çıkar. Çoğu olguda bu iki lezyon tipinin bir arada olduğu karışık lezyonlar daha yaygındır. Yerel antijen yüküne göre lezyonlar ilerleyebilir, tip değiştirebilir, stabil kalabilir hatta gerileyebilir. (42,43)

2.4. Tam Yöntemleri

Tüberkülozun ön tanısı klinik verilere dayanmakla birlikte kesin tanı laboratuvar yöntemleriyle konmaktadır. Mikrobiyolojik tanının tam ve doğru olarak

yapılabilmesi uygun örneğin, uygun yöntemle alınmasına, uygun şekilde laboratuvara gönderilmesine ve uygun şekilde işlenmesine bağlıdır. Enfeksiyonun yerine göre değişmekle birlikte, tanıda en sık kullanılan örnekler arasında balgam, bronkoskopik aspirasyon, gastrik lavaj, idrar ve BOS sayılabilir. Ancak genellikle balgam tercih edilir. (30)

Örneklerin işlenmesi: Tüberküloz etkeni bakterilerin izolasyonu için elde edilen klinik örnekler steril olanlar (BOS, plevral sıvı vb.) ve olmayanlar (flora içerenler) olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Steril örnekler 3500xg'de 20 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen çökelti doğrudan direkt mikroskopi ve kültür için kullanılabilir. Steril olmayan örnekleri lökosit, eritrosit, vücut sıvıları ve mukus gibi organik kalıntılardan arındırmak amacı ile homojenizasyon/dekontaminasyon ve örnekteki bakteri yoğunluğunu artırmak için konsantrasyon işlemi uygulanır. (44)

Homojenizasyon-dekontaminasyon-konsantrasyon işleminde en sık N-Asetil-L-Sistein (NALC) + Sodyum hidroksit (NaOH) ve NaOH (%3-4) gibi yöntemler kullanılmakla birlikte; zefiran-trisodyum fosfat, oksalik asit, setilpridinyum kloridsodyum klorid gibi farklı yöntemlerden de yararlanılabilir. (44)

N-Asetil -L-Sistein(NALC)+Sodyum hidroksit (NaOH) yöntemi: NALC mukolitik, NaOH dekontaminan ve sodyum sitrat klinik örnekte bulunabilecek ağır metal iyonlarını bağlayarak NALC'ün inaktive olmasını önlemek amacıyla kullanılır. NALC'nin %0.5-2 konsantrasyonunda balgam hızla gevşer, fibrilleri ayrılır. Vorteks türü bir karıştırıcı yardımıyla işlem desteklenir.

Dekontaminasyon amacıyla kullanılan NaOH'in de mukolitik etkisi vardır. Mikobakterilerin üzerlerini saran kalın, mumsu, hidrofobik yapıları nedeniyle zayıf alkalilere dirençli olmalarına karşılık dekontaminasyonun süresi ve alkali pH'nın düzeyi açısından bu basamak önemlidir. Final konsantrasyon %1 olacak şekilde, %2-4'lük NaOH hazırlanması ve örneğin bu konsantrasyonda ortalama 15 dakika süreyle bekletilmesi önerilmektedir. Sürenin 30 dakikaya çıkması durumunda, basillerin de zarar göreceği ve üreme özelliklerinin azalacağı bildirilmektedir. Daha sonra homojenize edilen örnek üzerine fosfat tamponu eklenerek nötralizasyon yapılır. 3500xg'de santrifüjlenerek çöktürülen örnek ekime hazır hale gelir.(44)

Resüspanse edilen sediment kullanılacak kültür yöntemine uygun olarak

besiyerine ekilir. Ayrıca direkt mikroskopik inceleme için lam üzerine yayma işlemi yapılır. (44,28)

2.4.1.Direkt Mikroskopik İnceleme

Tanıda ilk basamak, aside dirençli boyama yöntemlerinin uygulanmasıdır. Mikroskopik incelemede aside dirençli basil görülmesinden sonra, klinik ve radyolojik bulgular da tüberküloz tanısını desteklemek üzere, genellikle tüberküloz tedavisine hemen başlanmaktadır.

Mikobakterilerin Boyanma Özelliği: Mikobakterilerin boyanması oldukça zordur. Hücre duvarlarındaki uzun zincirli yağ asitlerinin (mikolik asitler) oluşturduğu yoğun lipid içerik, bakteriyolojide yaygın kullanılan gram boyalara karşı geçirgenliği sınırlar. Gram boyamada genellikle silik boyanmış, boncuklu gram olumlu basiller şeklinde görünürler.(28) Hücre duvarındaki mikolik asit rezidüleri, fuksin veya auramine O gibi arilmetan boyalarla stabil bileşikler yaparlar ve asit-alkol veya güçlü mineral asitler ile karşılaştıktan sonra bile boyayı bırakmazlar. Dekolarizasyon direnci şeklinde açıklanan bu özellikleri nedeniyle mikobakteriler “aside dirençli bakteriler” olarak tanımlanmaktadır. (28)

Aside dirençli boyama, mikobakterilerin lipidden zengin hücre duvarlarının primer boya ile boyanması ve renk giderici ajan asid alkolle muameleden sonra boyalı kalması esasına dayanmaktadır. Yayma duyarlılığı % 22-80 arasında değişmektedir. Direkt mikroskopi ile görülebilmesi için, balgamda her ml’ de 5000-10000 basil bulunması gereklidir. Örneğin tipi, enfekte eden mikobakteri türü, dekontaminasyon ve kontaminasyon işleminin etkisi, boyama tipi, yaymanın kalınlığı, yaymayı inceleyen laboratuvar personelinin deneyimi boyanın duyarlılığını etkileyen faktörlerdir. (28,45)

Boyama Yöntemleri: Boyanacak örneğin bir kısmı öze veya pipet kullanılarak lama transfer edilir. Konsantre örneklerde konsantrasyon işleminden elde edilmiş çöküntü kullanılır. Örnek lam üzerine yaklaşık olarak bir para boyutunda alan üzerine yayılır (1.5 – 1.5 cm boyutlarında). Mikobakteriler için başlıca iki boyama tekniği geliştirilmiştir.(47)

a.Karbolfuksin metodu (Ziehl-Neelsen,Kinyoun): Aside dirençli organizmalar kırmızı renkte görülür. Karbol fuksin boyamada, fuksin ve fenol (karbolik asit)

bileşimi kullanılır. Ziehl- Neelsen ve Kinyoun arasındaki temel farklılıklar fenol konsantrasyonu ve uygulama biçimindedir. Ziehl-Neelsen'de boyanın hücre içine girmesini kolaylaştırmak üzere preparata alttan ısıtma uygulanır. Isıyla yumuşayan mumsu yapıdaki kapsülden basilin içine geçen boya, hücre duvarındaki mikolik asitlere bağlanır. Isının uzaklaştırılmasıyla tekrar sertleşen mumsu yapı, boyanın hidroklorik asit ve etanol ile dekolarizasyon basamağında geri çıkmasını engeller. Kinyoun yönteminde ısıtma yerine boya konsantrasyonu daha yoğun hazırlanır ve preparatın üzerine döküldükten sonra 1 dakika yerine burada 2 dakika beklenilir. Ziehl-Neelsen ve Kinyoun boyama işlemleri sonucunda mikobakteriler, kullanılan zıt boyaya göre değişecek şekilde, mavi veya yeşil zeminde kırmızı basiller olarak görülürler. Zıt boya olarak genellikle metilen mavisi kullanılır.(47)

b.Florokrom metodu (auramin O, auramin-rhodamin): Aside dirençli organizmalar sarı-oranj renkte floresan verir şekilde görülür. Daha duyarlı ve hazırlanan preparatın daha hızlı taranmasını sağlayan florokrom boyalar da direkt mikroskopik incelemede kullanılabilir. Bu boyama yöntemlerinde, daha küçük bir büyütme ile daha geniş bir alan taranabilir ve preparatın taranması için gereken zaman azalır. Florokrom boyamada ana ilke fenollü fuksin yerine floresan boya kullanılmasıdır. Floresan boyalar, mikobakterilerin lipitten zengin hücre duvarına bağlanarak, görünür hale gelmesini sağlar. Ancak boya hazırlanması, amaçlanan hedef (doku, mikroorganizma, antijen antikor kompleksi vs.) ve boyama işlemi sırasında ısı-süre değişikliklerinin uygulanması gibi, bazı kriterlere göre, farklı floresan boyama yöntemleri uygulanabilir. Bu yöntemler arasında Auramin-Fenol boyama yöntemi, Glikerson ve Kanner'in floresanlı boyama yöntemi, Auramine-Rhodamine boyama yöntemi, Truant'ın modifiye Auramine- Rhodamine boyama yöntemi sayılabilir. (47)

Preparatların değerlendirilmesi: Karbolfuksin boyalı yaymalar ışık mikroskopunda x1000 büyütmede immersiyon ile incelenir. Yaymayı negatif olarak raporlamadan önce en az 300 alan taranmalıdır. Florokrom boyalı yaymalar floresan mikroskopta x250 veya x400 büyütmede taranır, Fakat tipik morfolojiyi doğrulamak için x1000 objektif gerekebilir. Yaymayı negatif olarak raporlamadan önce x250 büyütmede en az 30 alan taranmalıdır. (28,46,47)

Aside dirençli basil yaklaşık olarak 1-10 µm uzunluğunda ve tipik olarak ince, çubuk biçimli çomak olarak görülür, fakat eğilmiş veya bükülmüş görülebilir. Bakteri, boncuk dizisi olarak adlandırılan yoğun boyalı bölgeler veya bandlı görünüm oluşturan aralıklı boyanma bölgeleri gösterebilir. *M. tuberculosis* dışında bazı mikobakteriler pleomorfik görünebilir, uzun basillerden kokoid formlara kadar değişmektedir, boyanma özellikleri daha aynı tip dağılım göstermektedir. Centers for Disease Control (CDC)'ün onayladığı Kent ve Kubica'dan adapte edilen değerlendirme sonuçları Tablo 2'de gösterilmiştir. (28,46,47)

Tablo 2.2: Karbolfuksin ve Florokrom boyanmış yaymaların değerlendirilmesi. (28)

ASİDE DİRENÇLİ BOYANAN BASİL SAYISI/ ALAN*			SONUÇ
Karbol Fuksin(1000x)	Florokrom(250x)	Florokrom(450x)	
0	0	0	Olumsuz
1-2 /300 A	1-2/ 30A	1-2/70A	Şüpheli
1-9/ 100 A	1-9/ 10 A	2-18/50A	1+
1-9/ 10 A	1-9/ A	4-36/10A	2+
1-9/ A	10-90/ A	4-36/A	3+
>9/A	>90/A	>36/A	4+

*Alan (A)= Mikroskop Alanı

2.4.2. Kültür

Mikobakteri içerdiği düşünülen tüm klinik örnekler homojenizasyon ve dekontaminasyon işleminden sonra (gerekliyorsa) uygun besiyerlerine ekilmelidir. Çünkü (a) kültür direkt mikroskopiden daha duyarlıdır. (b) identifikasyon ve ilaç duyarlılık testleri için bakterinin üremesi gereklidir (c) kültürde üreyen mikroorganizmaların genetik tiplendirme çalışmaları epidemiyolojik değerlendirmeler için yararlıdır. Kültür yöntemlerinin duyarlılığı %80-85, özgüllüğü ise yaklaşık %98'dir. (48)

Kültür aktif tüberküloz tanısında altın standarttır. Balgam örneklerinde direkt mikroskopide basilin saptanabilmesi için 5000-10000 basil/ml olması gerekirken kültür 100 basil/ml basili saptayabilir.(45)

Mikobakterilerin ikiye bölünmesi için gerekli süre 16-18 saat kadardır ve izole edilmeleri için besiyerlerinin uzun süre inkübe edilmesi gerekir. Zorunlu aerop olan mikobakterilerin bulunduğu ortamda oksijen miktarının azalması, üreme hızlarının da azalmasına neden olur. Mikobakterilerin izole edilmeleri ve çeşitli özelliklerinin incelenmesi amacıyla kullanılan konvansiyonel besiyerleri katı ve sıvı olmak üzere iki tiptir. CDC mikobakterilerin izolasyonunda katı ve besiyerlerinin birlikte kullanılmasını önermektedir. (49)

a. Katı besiyerleri: Yumurta bazlı ve agar bazlı olmak üzere iki bölümde incelemek mümkündür. Patetes unu, gliserol, tuz, tam yumurta ya da yumurta sarısı içeren yumurta temelli besiyerleri arasında bugün en yaygın kullanılanı Löwenstein-Jensen (L-J) besiyeridir. Yumurta bazlı besiyerlerinde kolonilerin görünür hale gelmesi 18-24 günü bulmaktadır. Tipik koloni morfolojisi oluşturmaları ve daha bol üremeleri nedeniyle özellikle primer izolasyonda L-J besiyerinin kullanılması önerilir. Yumurta bazlı besiyerlerinin opak görünümlü olmasına karşın, agar bazlı besiyerleri şeffaftır. Bu nedenle, ekim yapılan besiyerleri 10-12 gün sonra mikroskop altında incelenirse, oluşan kolonileri görmek mümkündür. (28,49)

Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11 en çok tercih edilen agar bazlı besiyerleridir. Besiyerlerinin görünümü şeffaf olduğundan, ekim yapıldıktan 10-12 gün sonra mikrokoloniler görülebilir. Ancak pahalı ve raf ömürleri (+4°C'de yaklaşık bir ay gibi) nispeten kısadır. Besiyerlerinin depolanması, inkübasyonu ve hazırlanması da itina gerektirmektedir. (28)

Bunun yanı sıra kontaminasyona neden olan mikroorganizmaların üremesini etkin bir şekilde engellemek amacıyla selektif besiyerleri olan L-J Gruft, Mycobactosel LJ, Mitchison selektif 7H 11 de kullanılabilir. Primer izolasyonda besiyerlerinden en az birisinin selektif olması önerilir.(28, 50, 49)

b. Sıvı Besiyerleri: Sıvı besiyerleri içinde yer alan Middlebrook 7H9 ve Dubos tween albumin, mikobakterilerin stok suşlarının subkültürlerinin yapılması, duyarlık deneyleri ve diğer in vitro deneylerde inokulum hazırlanması amacıyla

kullanılır. Sıvı besiyerlerinde mikobakterilerin saptanması, katı besiyerlerine göre daha kısa sürede ve daha yüksek duyarlılıkta olmaktadır. Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri, çoğu hızlı kültür sisteminde temel besiyeri olarak kullanılmaktadır.(28)

c. Hızlı Kültür Sistemleri: Günümüzde birçok laboratuvarında, konvansiyonel besiyerlerinin yanı sıra tüberküloz etkeni bakterilerin izolasyon süresinin çok daha kısa ve izolasyon oranının çok daha yüksek olduğu hızlı kültür sistemleri rutin inceleme amacıyla kullanılmaktadır. Hızlı kültür sistemlerinin esasları, sıvı besiyerleridir. Bununla birlikte, bifazik ve katı besiyerlerinin kullanıldığı sistemler de mevcuttur ve bu sistemlerde gaz basıncındaki değişiklikler, CO₂ oluşumu ve oksijen kullanımı fluorometrik veya kolorimetrik olarak ölçülür. Primer izolasyonda sıvı besiyerlerine ilave olarak bir de katı besiyeri kullanılması CDC tarafından önerilmiştir ve bu kombinasyonla mikobakterilerin izolasyon şansının arttığı bilinmektedir. (49)

Hızlı kültür sistemleri cihaz veya bilgisayar ile değerlendirilip değerlendirilmemesine göre manuel, yarı otomatize veya tam otomatize sistemler olarak gruplandırılabilir.(28, 49)

Yarı otomatize BACTEC 460 TB(Becton Dickinson Diagnostic Instruments) sistemi, izolasyon, idantifikasyon ve duyarlılık deneylerinin uygulandığı bir sistem olarak uzun yıllardır başarı ile kullanılmaktadır. Sistemde *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) ile tüberküloz dışı mikobakterilerin (MOTT) ayrımı yapılabilmekte MTBC suşlarının primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılığına bakılabilmektedir. BACTEC 12B(Middlebrook 7H12) ve BACTEC 13A (Middlebrook 7H13) olmak üzere iki tip besiyeri içeren bu sistem; besiyerlerinde bulunan ¹⁴C işaretli palmitik asitin kullanılması ve metabolizma sonucu oluşan ¹⁴CO₂ nin 0-999 sayısal değerleri arasında üreme indeksi(GI) olarak ölçülmesi prensibi ile çalışmaktadır. Ekim işleminden önce besiyerlerine polimiksin B, azlosilin, nalidiksik asit, trimetoprim ve amfoterisin B (PANTA) içeren antibiyotik karışımı ilave edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü tarafından altın standart kabul edilmektedir. Başarı ile kullanılmakla beraber, sistemde yer alan besiyerlerinin radyoaktif madde içermesi ve cihazda yapılan rutin kontroller sırasında meydana gelen çapraz kontaminasyon sorun oluşturmaktadır. (49)

Tam otomatize sistemler arasında Myco-ESP(Extra Sensing Power)II, (Trek Diagnostics Inc), MB/Bact T (Organon Teknika), BACTEC 9000 MB (BD Biosciences) ve Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT) 960 (BD Biosciences) sayılabilir. Günümüzde alternatif izolasyon sistemlerinin geliştirilmesi için çalışmalar devam etmektedir. Birçok çalışmada tam otomatize sistemlerde üretme süresi ortalama ≤ 14 gün olarak saptanmıştır.(31) Kontaminasyon oranları açısından tam otomatize sistemler birbiri ile karşılaştırıldığında önemli bir fark bulunamamıştır ancak bu sistemlerde oran, BACTEC 460 TB ve katı besiyerlerine göre daha yüksektir.(49) Myco-ESP II, selüloz sünger ve Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içeren bir sistemdir. Sistemde mikroorganizmaların üremesi sonucu oksijen tüketimine bağlı olarak şişede oluşan gaz basıncındaki değişiklikler ölçülerek değerlendirme yapılır. Besiyerinde oluşan gaz basıncındaki değişiklik grafiksel olarak bilgisayarda görüntülenir. Sistem tüm klinik örnekler için uygundur. MB/Bact T, besiyerinin dip kısmında kolorimetrik bir sensor içeren ve oluşan CO₂ düzeyini ölçerek üremeyi değerlendiren bir sistemdir. Bilgisayar desteği bulunan sistemde besiyerleri sürekli kontrol altındadır. Steril örnekler ekilmeden önce besiyerlerine reconstitution sıvısı ilave edilirken; steril olmayan örneklerin ekiminden önce antibiyotik karışımı ilave etmek gereklidir. BACTEC 9000 MB, besiyerlerindeki oksijen kullanımının floresans ile belirlendiği bir sistemdir. Modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyerlerine ekimden önce PANTA ilave edilir. Sistemde balgam ve diğer solunum yolu örnekleri için Myco/F sputa, kan ve diğer steril vücut bölgelerinden alınan örnekler için MycoF/lytic besiyeri kullanılır. BACTEC MGIT 960 sisteminde kullanılan tüplerde, Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri ve dip kısımlarında oksijene duyarlı silikon bulunur. Klinik örnekler ekilmeden önce besiyerlerine kontaminasyonu engellemek için PANTA ilave edilir. Kullanılan besiyerlerinde herhangi bir üreme olmadığında oksijen varlığına bağlı olarak silikon tabakaya gönderilen UV ışımına karşı floresans oluşmazken; mikobakteri veya diğer mikroorganizmalar ürettiğinde oksijenin kullanılması sonucunda UV ışımına karşı floresans oluşmakta ve oluşan floresans miktarı üreme indeksi olarak değerlendirilmektedir. Tam otomatize bir sistem olmakla birlikte, UV ışığı altında makroskobik olarak da değerlendirme yapılabildiğinden manuel olarak kullanılmaya da uygundur. Kan dışındaki diğer tüm klinik örnekler için kullanılabilir.

Fazla sayıda örneği aynı anda kontrol edebilen MGIT 960 (960 örnek), BACTEC 9000 MB (240 örnek) , MB/BacT (240 örnek) ve ESP II (128/256/384 örnek inceleyen üç farklı cihaz) genellikle yüksek kapasite ile çalışan laboratuvarlarda tercih edilmekle birlikte; daha düşük kapasite ile çalışan laboratuvarlar için manuel sistemler önerilmektedir. (31, 49, 51)

Manuel sistemler içinde Septi-Check AFB(BD Biosciences), sıvı (Middlebrook 7H9) ve üç tip katı (L-J, Middlebrook 7H11, çukulatamsı agar) besiyerini içeren bifazik sistemdir. Çukulatamsı agar kontaminasyonu belirlemek amacıyla kullanılır. Kültür süresince besiyerleri ara sıra hafifçe çalkalanarak sıvı besiyerinin katı besiyerlerine teması sağlanmalıdır. Sistem kan dışındaki tüm klinik örnekler için uygundur. Kapasitesi az olan laboratuvarlar için uygundur. Yine manuel bir sistem olan MB Redox(Biotest Diagnostics Corp. NJ, ABD.) sisteminde mikobakterilerin izolasyonu amacıyla antibiyotik karışımı ve renksiz tetrazolium tuzu içeren modifiye Kirchner besiyeri kullanılır. Tetrazolium tuzu mikobakterilerin redoks sistemi sayesinde, hücre yüzeyinde granüler formda biriken pembe, kırmızı ve menekşe renginde formazona indirgenir ve üreme sonucu oluşan mikrokoloniler renkli partiküller şeklinde makroskobik olarak görülebilir. (49,50)

2.4.3. Serolojik Tanı Yöntemleri

İlk kez 1898 yılında tüberkülozlu hastaların serumlarında aglütinasyon testinin yapılması ile başlayan serolojik tanı yöntemleri duyarlılıklarının ve özgüllüklerinin düşük olması nedeniyle tüberküloz tanısında etkin bir şekilde kullanılamamıştır. Bu testlerin tanıda kullanılamamasının en önemli nedenleri arasında testlerin çoğunda antijen olarak kullanılan kültür filtratlarının, pürifiye protein derivelerinin (PPD) birden fazla epitop içermesi ve *M. tuberculosis* ile çapraz reaksiyon veren çevrede ve normal florada yaygın olarak bulunan diğer mikobakteriler ile sık karşılaşılması gösterilmektedir. Teknolojinin ilerlemesi ile birlikte *M. tuberculosis*'te bulunan antijenler saflaştırılmış ve bu antijenleri özgül olarak tanıyan monoklonal antikorlar elde edilerek tanıda kullanılan ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) gibi serolojik testlerin duyarlılıkları artırılmıştır. (52) Tüm gelişmelere rağmen bu testlerin duyarlılıkları %60 ile %80 arasında değişmiş, özgüllükleri ise tek özgül epitop arandığında %100'e yaklaşmıştır. (52)

ELISA, katı faz antikor kompetisyon testi gibi serolojik tanı yöntemleri uygulanabilmektedir. Bu yöntemler ile tüberkülozda olumlu sonuçlar ancak hastalığın ilerlemiş dönemlerinde alınmakta, bu dönemde direkt yayma ve kültür yöntemleri de pozitif sonuç verdiği için serolojik yöntemlerin tanıya ek bir katkısı olamamaktadır. (52)

Ayrıca yayma negatif akciğer hastalığı olma olasılığı daha fazla olan HIV enfekte kişilerde, antikor yapımı azalmış görünmektedir. Bu da serolojik testleri daha az duyarlı yapmaktadır.(52) Bu testlerin akciğer dışı tüberkülozlu ve balgam çıkaramayan tüberküloz ön tanılı hastalarda yararlı olabileceği düşünülmektedir.(52)

2.4.4. Moleküler Tanı Yöntemleri

Klasik laboratuvar tanı yöntemlerinden mikroskopinin özgüllük ve duyarlılığının düşük olması, kültür yöntemlerinin ise uzun zaman alması nedeniyle moleküler yöntemler tüberküloz laboratuvarlarına çok hızlı bir şekilde girmiş ve farklı uygulama alanları bulmuştur. Moleküler yöntemler klinik örneklerde bulunabilecek etkenin kısa sürede gösterilmesi, tanımlanması, alt tiplene ve ilaç direncinin saptanmasında yarar sağlayabilir. (53)

1985 yılında Kary Mullis tarafından PCR(polimeraz chain reaction) tekniğinin geliştirilmesi ile başlayan moleküler çalışmalar sonrası, tüberkülozun tanısında kromozomal DNA veya rRNA aranmasına yönelik çeşitli moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Hasta örneklerinden direkt olarak MTBC'in tanısı için bugün pek çok laboratuvarında uygulanmakta olan tekniklere ait henüz tam bir standardizasyonun bulunmaması, sıklıkla yalancı negatif ve pozitif sonuçların oluşmasına neden olabilmektedir. PCR uygulamalarında sıkça gözlenebilen kontaminasyon riskini ortadan kaldırabilmek, duyarlılık ve özgüllüğü arttırabilmek için bir çok yeni yöntem geliştirilmiş olmakla birlikte bir kısmı için halen çalışmalar devam etmektedir.(3)

Kullanımdaki Ticari Direkt Amplifikasyon Testleri: Klinik örneklerden mikobakterilerin saptanmasında başta PCR ve transcription mediated amplification (TMA) olmak üzere strand displacement amplification (SDA) ve ligaz chain reaction (LCR) gibi çeşitli amplifikasyon yöntemleri kullanılmaktadır.(3) Amplicor

M.tuberculosis testi (Roche Molecular System) tüm mikobakteri türlerinde ortak olarak bulunan 16S rRNA geninin (16S rDNA) 584 bç'lik bölgesinin PCR ile çoğaltılması ve oluşan DNA amplikonlarının MTBC'e özgü proplarla kolorimetrik yöntemle saptanması temeline dayanır. Yöntemin otomotize şekli Cobas Amplicor MTB olarak adlandırılmaktadır. Testte internal amplifikasyon kontrolü bulunmakta ve 6 saat içinde sonuçlanmaktadır. Amplicor direkt bakısı pozitif solunum örneklerinde tanısal amaçla kullanılması için FDA (food and drug administration) onayı almıştır. Solunum örnekleri için genel olarak duyarlılık %66.7-85.2, özgüllük %98.8-99.7 olarak bulunmakta; mikroskopi pozitif örneklerde duyarlılık %92.6-96.1'e çıkmakta, negatif olanlarda ise %48-71.7'ye düşmektedir.(3,52)

Amplified *M.tuberculosis* Direct (AMTD2) testi (Genn Probe) 16S rRNA'nın 42°C'de izotermal olarak TMA ile çoğaltılması ve oluşan RNA amplikonlarının MTBC'e özgü acridinium esterle işaretlenmiş DNA propları ile kemilüminisans yöntemle saptanması temeline dayanır. AMTD 2-2.5 saat içinde sonuçlanmakta ve testte internal amplifikasyon kontrolü bulunmamaktadır. Yöntemin tüm solunum örneklerinde tanısal amaçla kullanılması FDA tarafından onaylanmıştır.(3) BD ProbeTee energy transfer (ET) Direct TB System (DTB) testi (Becton Dickenson.) MTBC'e özgü IS6110 ve mikobakteri türleri için ortak 16S rDNA bölgesinin 52-50C°'de izotermal olarak SDA yöntemi ile çoğaltılması ve oluşan DNA amplikonlarının MTBC'e özgü floresan boya ile işaretlenmiş DNA propları ile florimetrik yöntemle saptanması temeline dayanır. DTB tanısal amaçla kullanılması için henüz FDA onayı almamıştır.(3, 52)

Mikobakterilerde tür ayrımı yapabilmek için 16s rRNA/DNA amplifikasyonunu takiben dizi analizi veya hibridizasyon yapılması veya "Heat shock protein 65" (*hsp*) geninin amplifikasyonu ve restriksiyon endonükleazlar ile kesimi kullanılmaktadır. 16S rRNA/DNA gen bölgesinin tüm bakterilerde ortak olan korunmuş bölgesinin olması ve bu korunmuş bölge içinde her bir mikroorganizma için özgül olan bölgenin (signature /hyper variable bölge) bulunmasından yararlanılmaktadır. Önce tüm bakterilerde ortak olan korunmuş bölgeye özgü primerlerle amplifikasyon yapılmakta, sonra ya aşırı değişken bölgenin dizi analizi yapılarak ya da türe özgü proplarla hibridizasyon yapılarak tür ayrımına gidilmektedir.(3, 54)

Yine mikobakteri türlerinin identifikasyonunda kullanılan DNA STRIP teknolojisinde türe özgü gen segmentlerinin tanımlanması esastır. Bu amaçla öncelikle kültürden veya hasta materyallerinden DNA izolasyonunu takiben, PCR ile hedefe özgü 16S-23S rRNA bölgesinin amplifikasyonu ve ardından hedef DNA dizisi komplementeri olan işaretli DNA problarla nitroselüloz bir membran üzerinde revers hibridizasyon sonrası mikobakterilerin identifikasyonu yapılabilmektedir. Hibridizasyon aşamasında, amplifiye edilmiş ve biyotinle işaretli DNA materyali önce spesifik oligonükleotid problar ile hibridize edilir. Hibridizasyon işlemi takiben ortama ilave edilen alkalin fosfatazla işaretlenmiş streptavidin ortamda bulunan hibride bağlanır. Kromogen ile inkübasyon sonrası, biotin-streptavidin bağlanması kolorimetrik bir sistemle tespit edilerek görsel olarak yorumlanmaktadır.(55, 56)

GenoType Mycobacteria Direct (Hain Lifescience, Nehren- Germany) mikobakterin moleküler tanısında kullanılmak üzere ticari olarak mevcut DNA strip teknolojisi ile üretilmiş bir revers hibridizasyon yöntemi olan Line Probe Assay (LİPA)'ler arasında doğrudan hasta örneğinden identifikasyon amaçlı kullanılır. (55, 56)

GenoType Mycobacteria Direct (Hain Lifescience, Nehren- Germany): Hedef RNA'nın izolasyonunu takiben iki ana kategoride gerçekleşen bu testin süresi yaklaşık 6 saattir. Hazırlanan hasta örneklerinden ekstrakte edilen mikobakteriye ait hedef rRNA, öncelikle izotermal olarak NASBA (Nükleik asit dizi bazlı amplifikasyon) yöntemi ile 41°C'de amplifiye edilir. (Thermalcykler ihtiyacı yoktur). Amplifikasyonu takiben Revers hibridizasyon reaksiyonu esasına göre üretilmiş striplerde hibridizasyon işlemi gerçekleştirilerek idantifikasyon sağlanır. Yüksek özgüllüğe sahip olan bu test ile klinik olarak önemli mikobakteri türlerinden *M. tuberculosis complex*, *M. malmoense*, *M. avium*, *M. kansasii* ve *M. intracellulare* tanımlanabilmektedir.

NASBA Reaksiyonu: Bu reaksiyon için üç farklı enzim kullanılmaktadır. Revers transkriptaz (RT), RNA Polimeraz (T7-RNA-Pol) ve RNAse H. Hedef, ribozomal RNA olup aynı zamanda canlı basil varlığının gösterilmesine olanak

sağlar. Çalışmada 500-1000 µl dekontamine edilmiş hasta örneği kullanılır. Tercihan pulmoner örneklerde çalışılmakla birlikte ekstrapulmonar örneklerden de çalışılabilmektedir.

Reaksiyon üç aşamada gerçekleşir:

1. aşama, Hedef RNA'nın (sense RNA) birinci primer yardımıyla RT enzimi sayesinde DNA kopyası çıkarılır.
2. aşama, ortamdaki DNA:RNA hibritindeki RNA molekülü, RNase H tarafından kesilerek uzaklaştırılır
3. aşama, ikinci primerle RT enzimi aracılığıyla DNA'nın kopyası çıkarılır. Bunu takiben T7-RNA-Polimeraz enzimi aracılığı ile bu DNA molekülünden RNA kopyası oluşturulur. Elde edilen bu kopya antisense RNA molekülüdür. İşlemler bu basamaktaki gibi tekrar edilirler ve sonuçta milyonlarca kopya RNA amplikonları elde edilmiş olur.

Revers Hibridizasyon: Önce hasta örneklerinden NASBA reaksiyonu ile elde edilen amplifikasyon ürününün kimyasal denatürasyonu, bunu takiben membrana bağlı problemlerle tek sarmallı, biyotinle işaretli amplikonların hibridizasyonu, yıkama işleminin ardından ortama ilave edilen streptavidin/alkalin fosfataz (AP) konjugat ile hibritlerin boyanması ve kurutulan strip üzerinde oluşan bantların değerlendirilerek identifikasyon işleminin tamamlanması basamaklarından oluşur.

2.4.5. Antitüberküloz Tedavi

Antitüberküloz Tedavi Tarihçesi: Antitüberküloz tedavilerde dönüm noktası 1944'te streptomisin (SM) devreye girmesi ile başlamıştır ve bu ilacın keşfi araştırmacılarına Nobel ödülü kazandırmıştır; ama kısa bir süre sonra görülen nüksler hekimlere tüberkülozda ilaç direncini öğretmiştir. Üç yıl sonra zayıf etkili bir tüberklostatik olan para aminosalisilik asidin (PAS) tedaviye eklenmesiyle SM direncinin en çok %9'a kadar çıkabildiği gösterilince tüberkülozda kombine tedavinin önemi anlaşılmıştır. Ancak PAS alan hastaların yarısından fazlasında gösterilen gastrointestinal yan etkiler önemli bir sorun oluşturmuştur; hastaların yaklaşık 1/3'ünde ilaç kesilmek zorunda kalınmıştır. (12)

1950'nin başlarında izoniazid ve izleyen yıllarda pirazinamid, tiasetazon, etionamid, protionamid ve etambutol bulunmuştur. Bu keşifler senatoryumların sonunu getirmiş ve tedaviler ayaktan yapılmaya başlanmıştır. Kemoterapideki son

devrim 1966'da rifampisinin kullanıma girmesi olmuştur. Bu keşif şu anda da uygulanmakta olan kısa süreli tedavinin yolunu açmıştır.(8, 12)

Tedavide Kullanılan İlaçlar: Tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlar ikiye ayrılırlar: 1) Kabul edilebilir düzeydeki toksisite profili ile birlikte en efektif olan “birinci sıra” ilaçlar, 2) Genellikle daha az etkili, daha pahalı ve daha çok toksisitesi olan “ikinci sıra” ilaçlar. Birinci sınıfta bulunanlar; başta izoniazid (İNH) olmak üzere, rifampisin (RİF), etambutol (ETB), streptomisin (SM) ve pirazinamid (PRZ)'dir. Tüberkülozlu hastaların büyük çoğunluğu bu ilaçlarla başarılı bir şekilde tedavi edilebilirler. İkinci sınıfta etionamid, paraminosalisilik asid, tiasetazon (amitiozon), sikloserin, siprofloksasin, ofloksasin ve aminoglikozid olan (streptomisin-dışı) viomisin, kapreomisin, kanamisin ve amikasin bulunur. (12, 58)

İzoniazid izonikotidik asidin hidrazididir ve halen mevcut olan antitüberküloz ilaçların en güçlüsüdür. Esas etkisi aktif olarak üremekte olan bakteriler üzerinedir.

Rifampisin bir rifamisin türüdür. Tüberküloz tedavisinde izoniazid'den sonra ikinci önemli ilaçtır. Hem hızlı çoğalan, hem de dormant duruma geçmiş mikobakterilere etkilidir. Gerek hücre dışındaki ve gerekse hücre içindeki mikobakterilere bakterisid etki yapar. Mikobakterilerin RNA polimeraz enzimini inhibe eder. Bütün tüberküloz ilaçları içinde etki gücü bakımından izoniazid'e en yakın ilaç olması, yan etkilerinin ondan daha az olması ve diğer ilaçlara dirençli suşlara karşı etkili bulunması bu ilacın değerini artırır. (12)

Direnç Sorunu: Tüberküloz basillerinde direnç, doğal olarak direnç genlerinin varlığına veya spontan mutasyonlara bağlı olarak gelişmektedir. Bakteriler arası gen aktarımı yoluyla direnç oluşmamaktadır. Plazmitlere bağlı direnç tanımlanmamıştır. Doğal direnç olasılığı: RİF için 10^{-8} , İNH için 10^{-6} , İNH+ RİF için 10^{-14} kadardır. (59)

Direnç beş mekanizma ile oluşmaktadır:

- 1- İlacın hücre içine alınımının azalması (Dormant basillerde görülmekte),
- 2- Artmış efluks: İNH direnci örnek,
- 3- Hedef molekülde değişiklik: İNH, RİF, ETB, SM ve kanamisin direnci,
- 4- Ön ilacın etkin ilaç haline dönüşümünü sağlayan enzim aktivitesinde azalma veya kayıp: İNH ve pirazinamid direnci,
- 5- Hedefin aşırı salgılanması: İNH direnci (60).

Primer direnç: Henüz ilaçlarını kullanmamış veya bir aydan daha kısa süre ilaç almış yeni tüberküloz hastalarında saptanan dirençtir. Primer direnç; basilin alındığı kaynağa ait olan dirençtir. Bir toplumdaki sekonder direnç oranıyla paralellik göstermektedir. Primer direnç oranının yüksek olması o toplumda uygulanmakta olan tüberküloz korunma ve kontrol önlemlerinin yetersizliğini yansıtmaktadır. (61)

Sekonder direnç: Başlangıçta duyarlı olan basillerle infekte olan tüberküloz hastasında, uygun olmayan tedaviye (ilaç seçimi, erken ilaç kesme, tedaviye uyumsuzluk) bağlı olarak dirençli mutantların artması sonucu gelişen dirençtir. Artmış sekonder direnç, uygulanmakta olan tüberküloz tedavi protokolünün yetersizliğinin göstergesidir. (61)

Direnç Gelişmesinde Etkili Faktörler: Anti-tüberküloz ilaçlarla karşılaşmamış olan *Myobacterium tuberculosis* izolatları klinik olarak dirençli değildirler. İlaça dirençli suşlar genellikle antibiyotiklerin hatalı kullanımıyla ortaya çıkmaktadır. Çoğul ilaca dirençli (ÇİD; en az RİF+İNH ikilisine direnç) suşlar, adım adım direncin birikimiyle orta çıkmaktadır: ÇİD tüberküloz insan yapımıdır.(60)

Ülkemiz ve tüberküloz insidansının yüksek olduğu ülkelerdeki önemli sorunlardan biri duyarlılık testlerinin düzenli olarak yapılamamasıdır. Önerilen, her hastaya ait ilk *M.tuberculosis* izolatı için duyarlılık testinin yapılması, iki aylık tedaviye rağmen kültürü pozitif olan hastalarda tekrarlanmasıdır. NCCLS 2003 duyarlılık test önerisi: *M.tuberculosis* için başlangıçta İNH, RİF, ETB ve PRZ test edilmeli, izolat RİF veya diğer herhangi iki primer ilaca dirençli bulunur ise sekonder ilaçlara duyarlılık testi yapılması yönündedir. (60)

Duyarlılık testlerindeki diğer önemli sorun ise klasik yöntemlerin zaman alıcı olmasıdır. Kültürden sonra en az 1-2 hafta gereklidir. Yeni moleküler yöntemler hızlı, ancak pahalıdır, deneyimli personel ve gelişmiş laboratuvar olanakları gerektirmektedir. Ayrıca bazen dirençli izolatların tamamı saptanamamakta ve dirençten sorumlu mutasyonların hepsini araştırmak mümkün olmamaktadır. Üstelik bazı kökenlerde direncin mekanizması henüz aydınlatılamamıştır. (60)

Mikobakterilerde Direncin Saptanmasında Moleküler Yöntemlerin Kullanılması: PCR teknolojisi ile mikobakterilerin başta rifampisin olmak üzere, izoniazid, streptomisin, etambutol, klaritromisin ve florokinolonlara olan direnç durumları hakkında bilgi edinilebilmektedir. (62)

Mikobakterilerde RİF direnci, özellikle çoğul ilaç direncinin önemli bir göstergesidir. Kısa sürede saptanması tedavi protokolünün belirlenmesi açısından oldukça yararlıdır. RİF, RNA polimeraz enziminin β alt ünitesine bağlanarak transkripsiyon ve RNA'nın uzamasını engellemektedir. Mikobakterilerdeki rifampisin direnci, DNA'ya bağımlı RNA polimeraz enziminin β alt ünitesini kodlayan *rpoB* genindeki mutasyonlarla ilişkilidir. Dirençli suşların %95'inde mutasyonlar *rpoB* genindeki 81-baz çiftlik kor bölgesinde bulunmaktadır. Bu bölgedeki mutasyonların kısa sürede gösterilmesi amacıyla PCR-baz dizi analizi, PCR-“line probe assay” gibi yöntemler geliştirilmiştir. (63)

İNH direncinin moleküler yöntemlerle araştırılması oldukça kompleks bir iştir. Araştırmalar en az dört (*katG*, *inhA*, *ahpC* ve *kasA*) gende değişikliklerin olduğunu göstermiştir. Bunlardan *katG* genindeki mutasyonun dirençteki önemi açık olarak gösterilmiştir. Bu gendeki yalnızca bazı mutasyonların (315 nolu kodon) yüksek seviyede ilaç direncinden sorumlu olduğu, diğerlerinin ise dirençle ilişkili olmadıkları belirtilmektedir. (62, 64)

Direncin saptanmasında kullanılan ticari ürünler arasında Revers hibridizasyon esasına dayalı, DNA strip teknolojisi (LİPA) ile hazırlanan ticari ürünler yer alır. Bunlar INNO-LİPA Rif TB ve GenoType MTBDR'dir. Bu ürünler, nitrosellülöz membran üzerinde dirençten sorumlu gen bölgesine ait duyarlı ve mutant dizileri içeren probalar ihtiva ederler. Uygulamada kültür ortamında elde edilen ve direnç geni araştırılacak her izolat için PCR ile çoğaltma işlemi gerçekleştirilir. Takiben dirençten sorumlu gen bölgelerine ait DNA molekülleri bu probalar ile hibridizasyona bırakılır. Hibridizasyon sonrası mutant dizilere bağlanma durumu “dirençli” olarak yorumlanır. Test süresi yaklaşık 3-4 saat kadardır. GenoType MTBDR (Hain Lifescience, Nehren- Germany) aynı teknoloji ve test prensibine dayalı olarak hem RİF hem de İNH'e karşı oluşan mutasyonları tespit edebilen bir ürünken, INNO-LİPA Rif TB (Inno-Genetics NV, Ghent, Belgium) sadece RİF direncini araştırmada kullanılan aynı paralelde bir üründür. (55)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız Etik Kurul tarafından 07.06.06 tarihinde, 7 sayılı karar ile onaylandı. Ocak 2007-Nisan 2007 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nin çeşitli kliniklerinden, Eskişehir Verem Savaş Dispanseri'nden ve Taksim Verem Savaş Dispanseri'nden akciğer tüberküloz şüphesi olan kişilerin balgam örnekleri toplandı. İlgili birimlerden alınan 64 balgam örneği çalışmaya dahil edildi. Bütün örnekler karbolfuksin metodu (kinyoun) ve florokrom metodu (fnollü auramin) ile direkt mikroskopik inceleme yapıldı. GenoType Mycobacteria Direct (Hain Lifescience) testi ile *Mycobacterium tuberculosis* complex arandı. Tüm örneklerin Löwenstein-Jensen ve Bactec 12B besiyerlerine ekimi yapıldı. Üreyen örneklerde BACTEC 12B ve GenoType MTBDR ile İNH ve RİF direnci arandı. Kontaminasyon ve bulaş riski taşıyan tüm işlemler güvenlik kabininde yapıldı. Tüm örneklerde yöntemlerin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri kültür sonuçlarıyla karşılaştırılarak hesaplandı. Duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değerle ilgili tanımlamalar aşağıda verilmiştir.(57)

Duyarlılık: Gerçek pozitiflik / (Gerçek pozitiflik+ Yalancı negatiflik)

Özgüllük: Gerçek negatiflik / (Gerçek negatiflik+ Yalancı pozitiflik)

Pozitif Prediktif Değer (PPD): Gerçek pozitiflik / (Gerçek pozitiflik+Yalancı pozitiflik)

Negatif Prediktif Değer (NPD): Gerçek negatiflik / (Gerçek negatiflik+Yalancı negatiflik)

3.1. Direkt Mikroskopik İnceleme

Örneklerden iki direkt yayma ve iki adet homojenize-dekontamine yayma olmak üzere dörder adet yayma hazırlandı.

Direkt Yayma: Balgamın mukoid bir bölgesinden öze veya pipet kullanılarak bir miktarı lama transfer edildi.

Yoğunlaştırılmış Yayma: Homojenizasyon-dekontaminasyon-konsantrasyon işlemleri uygulanan balgam örneğinin sedimentinden bir damla alınıp, bir lam üzerinde ince tabaka halinde(1.5 – 1.5 cm) yayıldı.

Homojenizasyon-dekontaminasyon-konsantrasyon işlemi N-Asetil -L-Sistein (NALC) + Sodyum hidroksit (NaOH) yöntemi ile yapıldı. Bunun için Homojenizasyon - Dekontaminasyon Kiti (RTA laboratuvarları Gebze/Kocaeli) kullanıldı.

N-Asetil -L-Sistein (NALC) + Sodyum hidroksit (NaOH) yöntemi:

NALC mukolitik, NaOH dekontaminan ve sodyum sitrat klinik örnekte bulunabilecek ağır metal iyonlarını bağlayarak NaOH'i stabilize eder, hem de NALC'nin bu iyonlar nedeniyle inaktive olmasını engellemek amacıyla kullanılır. NaOH, oldukça etkili bir dekontaminanttır. Ayrıca emulsifiye edici etkisi de olduğundan mukolitik olarak da yararlanır. NaOH ile birlikte kullanılması, örneğin karşılaştığı NaOH konsantrasyonunu ve bununla karşılaşma süresini azaltarak, basillerin NaOH'in toksik etkisinden zarar görme riskini azaltmış olur.

Homojenizasyon-Dekontaminasyon Kiti (RTA laboratuvarları) içeriği:

- 1.Örnek toplama tüpü: N-asetil-L-sistein (NALC),25-50mg 50ml içinde. 4mm çapında cam boncuklar içeren polipropilen tüpler.
- 2.Sodyum hidroksit (NaOH) % 3 ve trisodyum sitrat % 2.94 solüsyonu, 10ml, polipropilen tüplerde
- 3.Steril fosfat tamponu ($\text{Na}_2\text{HP0}_4$, KH_2PO_4) 50ml, polipropilen tüplerde (pH:6.8)

Yöntem: Örnek 50 ml'lik örnek toplama tüpüne aktarıldı ve üzerine klinik örneğin miktarı kadar NaOH + Sodyum sitrat çözeltisi ilave edildi. Örnek 10 ml'den fazla ise en pürülan, mukoid ve kanlı kısmından 10 ml alındı. Örnek + NALC + NaOH + Sodyum sitrat karışımını içeren boncuklu tüpler 30 saniyeyi geçmeyecek şekilde vortekslendi ve oda ısısında 15 dakika bekletildi. Bu süre aşılmasına dikkat edildi. Süre tamamlandığında nötralizasyon amacı ile örnek toplama tüpünün 50 ml işaretine kadar fosfat tamponu (pH 6.8) ilave edilip, karışım el yardımı ile alt-üst edildi. Fosfat tamponu ilave edilmiş tüpler, bakteri yoğunluğunu artırmak için 3500x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant, dikkatlice içinde 1/10-1/50 dilüe

edilmiş sodyum hipoklorid bulunan bir kaba boşaltıldı. Örnek toplama tüpünde kalan sedimente 12.5 ml çizgisine kadar tekrar fosfat tamponu ilave edildi ve vorteksledi. Fosfat tamponu ilave edilmiş tüpler, tekrar 3500x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Sedimentin korunmasına özen gösterilerek, süpernatant dikkatlice içinde 1/10-1/50 dilüe edilmiş sodyum hipoklorid bulunan bir kaba boşaltıldı. Örnek toplama tüpünde kalan sediment yapılacak tüm işlemler için hazır hale getirildi.

Boyaların Hazırlanması:

Kinyoun's Karbolfuksinin Hazırlanışı: Solüsyon 1:20 ml % 95 etanolde 4.0 g bazik fuksin çözüldü. Solüsyon 2:100 ml distile suda 8.0 g fenol kristalleri çözüldü ve ısıtıldı. Çalışma solüsyonu: Solüsyon 1 ve 2 birleştirildi. Adı, hazırlama ve son kullanma tarihi şişe üzerine etiketlendi.(3 ay süreyle oda ısısında saklanır) Renk giderici ajan: %3 asid-alkol: 3 ml hidroklorik asidi, 97 ml %95 etanole dikkatlice eklendi. Adı, hazırlama ve son kullanma tarihi şişe üzerine etiketlendi.(3 ay süreyle saklanabilir) Zıt boya: Metilen mavisi kullanıldı. 100 ml distile suda 0.3 g metilen blue klorürü çözüldü. Adı, hazırlama ve son kullanma tarihi şişe üzerine etiketlendi. (3 ay süreyle oda ısısında saklanabilir)

Kinyoun karbolfuksin (soğuk karbolfuksin) boyama: Yaymalar hazırlanırken yeni ve temiz lam kullanılmasına özen gösterildi. Her örnekten bir tane direkt, bir tane homojenizasyon-dekontaminasyon işleminden sonra olmak üzere iki adet yayma uygun şekilde hazırlandı ve yayma biyolojik güvenlik kabininde havada kurutuldu. Elektrikli lam ısıtıcısında 65-70°C'de en azından 2 saat süreyle tespit edildi. Tüm yayma Kinyoun karbolfuksin ile kaplandı ve 2 dakika süreyle boyanması beklendi ve suyla yıkandı. Lam % 3 asid alkolle kaplandı ve yıkandı. Yıkama sonucu akan sıvı renksiz akıncaya kadar renksizleştirildi ve su ile yıkandı. Lam metilen mavisi ile (zıt boya) kaplandı, 20-30 saniye bekletildi ve su ile iyice yıkandı. Yayma havada kurutuldu ve 100'lük immersiyonlu objektif ile incelendi.

Preparatların Değerlendirilmesi: Preparatlar, immersiyon objektifiyle, x1000 büyütmede ortalama 300 alan gezilerek değerlendirildiler. Bunun için, lamın uzun kenan boyunca birbirine paralel en az 3 hat incelendi. Metilen mavisiyle mavi renkte boyanan zeminde, karbol fuksin ile kırmızı boyanan ince basillerin saptanmasıyla,

ARB pozitif olarak değerlendirildiler. Pozitif yaymalar basillerin yoğunluğuna göre +1, +2, +3 ve +4 olarak derecelendirildi. Boyama işlemi sırasında yanlış pozitifliğe yol açabileceği için, boya kristallerinin oluşmamasına ve kullanılan boyada tortu bulunmamasına dikkat edildi.

Florokrom aside dirençli boyama: Çalışmamızda floresan boya olarak Auramin-Fenol yöntemini kullandık. Her örnekten bir adet direkt, bir adet yoğunlaştırılmış olmak üzere iki adet yayma 05151 Fluorescent Stain Kit for Mycobacteria (Fluka) ile boyanarak değerlendirildi.

Kit İçeriği: Fenolik auramin solüsyonu (Fluka 30503): 0.3g Auramin O, 3.0 gr Fenol, 100ml distile su. Asit alkol solüsyonu(Fluka 56694): 99.5ml %75 etanol,0.5gr sodyum klorid, 0.5ml hidroklorik asit. Potasyum permanganat solüsyonu (Fluka 81199): 0.1gr Potasyum permanganat, 100ml distile su

Yayma fenolik auramin solüsyonu ile kaplandı. Yaymanın üzeri kurumadan 15 dakika süreyle boyanması sağlandı ve süre sonunda suyla yıkanarak fazla su lamdan akıtıldı. Lam asit alkol solüsyonu(dekolorizasyon) ile yıkandı ve 2-3 dakika dekolorizasyon için beklendi ardından suyla yıkanarak fazla su lamdan akıtıldı. Lam potasyum permanganat solüsyonu ile (zıt boya) kaplandı ve 2 dakika süreyle boyanması sağlandı, su ile yıkandı ve fazla su lamdan akıtıldı. Yayma havada kurutuldu. Fazla bekletilmeden (24 saat içinde) floresan mikroskopi ile x250 (en az 30 alan) veya x450 'lük (en az 50 alan) büyütme ile tarandı. Karanlık bir zeminde sarı-yeşil ince, kıvrık, içi tanecikli floresan veren bakterilerin varlığı pozitif olarak yorumlandı. Floresan veren basilin karakteristik morfolojisi x1000 'lik büyütmede immersiyonlu objektif ile doğrulandı. Pozitif yaymalar basillerin yoğunluğuna göre +1, +2, +3 ve +4 olarak derecelendirildi. (28, 40, 46)

3.2. Kültür

a. Löwenstein-Jensen Besiyerine ekim: LJ besiyeri: monopotasyum fosfat, magnezyum sülfat, magnezyum sitrat, asparagin, gliserol, distile su, patates unu, malaşit yeşili, homojenize edilmiş tam yumurta içerir(1,12). Çalışmada kullandığımız LJ besiyeri, (Diomed İstanbul) firmasından hazır olarak temin edilmiştir. (31)

Homojenize dekontamine edilmiş klinik örneklerin sedimentinden 1 ml'lik disposable enjektörle alınarak, besiyerlerinin yüzeylerine 0.1 ml miktarda bırakılıp yayıldı. Besiyerine absorpsiyonun sağlanması için tüpler, eğik yüzeyleri yukarıya bakacak şekilde, kısa bir süre yatık tutulduktan sonra, kapakları hafif gevşek bırakılarak 37°C' de inkübasyonları başlatıldı. Birinci hafta sonunda kültürler tekrar değerlendirilerek kapakları sıkıştırıldı ve inkübasyona devam edildi. İki günde bir üremeleri kontrol edildi. Üreme saptananların inkübasyonları sonlandırıldı, saptanmayanlar için toplam 8 hafta inkübasyona devam edildi. Oluşan kolonilerden preparat hazırlandı ve kinyoun yöntemiyle boyanarak ARB varlığı doğrulandı.(28)

b. Bactec 12B Besiyerine ekim: Kontaminasyonu önlemek amacıyla, Bactec 12B besiyerine kültür işlemi uygulanmadan önce ilave edilen ve liyofilize halde bulunan PANTA, 5ml PANTA Reconstituting Fluid (PRF) ile çözüldü. Çeşitli antibiyotikleri içeren bu çözelti kültür işleminden önce, besiyeri şişelerinin ağzı %70'lik alkolle silinerek, her Bactec 12B(Middlebrook 7H12) besiyerine 0.1 ml ilave edildi. PANTA solüsyonu sulandırıldıktan sonra aşağıdaki antibiyotik konsantrasyonları elde edildi:

Polimiksin B	50 ünite/ml
Azlosilin	10 mcg/ml
Nalidiksik asit	20 mcg/ml
Trimetoprim	5.0 mcg/ml
Amfoterisin B	5.0 mc/ml

0.1 ml PANTA solüsyonu ilave edildikten sonra, homojenize-dekontamine balgam örneklerinden 1 ml'lik disposable enjektörle 0.4-0.5 ml alınarak BACTEC 12B besiyerine ekildiler. Ekim işleminden sonra besiyerlerinin ağzı tekrar alkol ile temizlendi ve besiyerleri yarı otomatize BACTEC 460 TB (Becton Dickinson) sisteminde değerlendirildi.

Balgam örneklerinin ekildiği Bactec 12B besiyerleri 37°C'de, 6 hafta süre ile bekletildi ve ilk iki hafta, haftada iki kez, son dört hafta, haftada bir kez BACTEC 460 TB otomasyon cihazında kontrol edildi. Bu süre sonunda üreme göstermeyen kültürler negatif olarak değerlendirildi. (28)

Balgam örneği mikobakteri içeriyorsa, bu mikobakteriler 12B besiyerindeki ¹⁴C işaretli substratı (palmitik asit) kullanarak, besiyerinin üzerindeki atmosfere

$^{14}\text{CO}_2$ çıkarmaktadır. BACTEC 460 TB cihazında yapılan kontroller sırasında şişeden çekilen gaz ortamındaki bu $^{14}\text{CO}_2$ varlığını gösteren radyoaktivitenin 0-999 sınırları içindeki sayısal değeri belirlemektedir. Bu sayılar üreme indeksini (GI) gösterir ve otomatik olarak kaydedilir. Bu sistemle kontrol edilen 12B besiyerlerinin GI değeri ~ 10 olduğunda, bu şişeler günlük kontrole alındı ve GI değerleri her gün takip edildi. GI değeri ~ 50-100'e yükselen besiyerlerindeki üreme Kinyoun yöntemiyle boyanarak incelendi. Boyalı preparatta saf halde aside dirençli basil görülen kültürler, mikobakteri üremesi pozitif olarak kabul edildiler. Altı haftalık inkübasyon sonunda üreme indeksi <10 olan örnekler ise üreme açısından negatif olarak kabul edildi. ARB pozitif üremelerin *M.tuberculosis* complex (MTBC) ve tüberküloz dışı mikobakteri (MOTT) ayrımı NAP testi ile yapıldı.(66)

BACTEC NAP (p-Nitro-a-acetylamino-β-hydroxypropionophenone) Testi:

NAP *M. tuberculosis* complex'in üremesini selektif olarak inhibe eder. Diğer mikobakteri türleri NAP ile inhibe olmaz veya kısmen inhibe olabilir. Üreme yoksa bakterinin *M. tuberculosis* complex'e ait olduğu düşünülür.

Yöntem: 12B şişesinin GI'i 50-100'e ulaştığında, besiyeri karıştırılarak 1 ml besiyeri NAP flakonuna aktarıldı. Kalan 3 ml besiyeri kontrol olarak kullanıldı. GI 100'ü geçen kültürler için NAP testinden önce ekim yapılmamış BACTEC 12B besiyeri (Middlebrook 7H12) ile dilüsyon yapıldı. Dilüsyon oranları aşağıda gösterilmiştir.

GI Miktarı Dilüsyon

50-100 Dilüsyon yapılmadı

101-200 0.8 ml

201-400 0.6 ml

401-600 0.4 ml

601-800 0.3 ml

801-999 0.2 ml

999>1 0.1 ml

Dilüsyon yapıldıktan sonra besiyerinin 1 ml'si NAP flakonuna aktarıldı. Artan besiyeri kontrol olarak kullanılmak üzere inkübe edildi. Hem inokülasyon yapılan primer izolasyon şişesi (kontrol), hem de NAP flakonları günlük olarak 2-7 gün süre ile okundu, GI kaydedildi.

Değerlendirme: Sonuçlar 4 günden kısa olmamak kaydıyla 2-7 gün içinde değerlendirildi. Kontrol şişesinin GI' i artmasına rağmen NAP testi şişesinin GI' i azalıyor veya değişmiyorsa MTBC, artış gösteriyorsa MOTT olarak değerlendirildi.

MTBC dışında diğer mikobakterilerden *M. kansasii*, *M. gastri*, *M. szulgai*, *M. terrae* ve *M. triviale*' nin bazı suşları NAP ile kısmen inhibe olabilir. Bu durumda ilk 2-4 günlük okuma sonuçları yanlış değerlendirilebilir. Sonuç vermeden önce inkübasyonun 2-3 gün daha uzatılması bu hatayı önleyecektir. Kontrol şişesindeki (orijinal kültür şişesi) günlük GI artmaya devam etmelidir, artış göstermiyorsa NAP sonucu değerlendirmeye alınmamalıdır.

M. tuberculosis complex: inokülasyondan sonra ardışık iki GI' de önemli bir azalma (%20); ilk iki gün hafif, fakat önemli olmayan bir artış ve ardından artışın olmaması veya azalma olması

Tüberküloz dışı mikobakteri: Günlük GI' in dört gün içinde 400 ve üzerine çıkması; inokülasyondan sonra ilk 1-2 gün içinde artış olmaması veya hafif bir azalma, iki günün ardından önemli bir artış (%20) olması olarak yorumlandı.(28, 65,)

RİF ve İNH direncinin BACTEC 12 TB ile saptanması: İNH ve RİF duyarlılık testinde besiyeri olarak Bactec 12B şişeleri, BACTEC 460TB kültür sistemi ile kullanıldı. Bactec 12B şişesindeki üreme indeksleri (Growth Indeks = GI) 500-800'e ulaştığında antitüberküloz ilaç duyarlılık testi başlatıldı. GI 800-999 arasında olanlar 1:1 oranında dilüe edildikten sonra duyarlılık testine alındı. Antibiyotik duyarlılık testi için SIRE (Streptomisin, isoniazid, rifampisin, etambutol) içeren kitden son konsantrasyonları İNH için 0.1 µg/ml ve RİF için 2.0 µg/ml olmak üzere iki antibiyotik de 5ml distile su ile hazırlandı. (67)

İlaçların hazırlanmış olan kritik konsantrasyonları BACTEC 12 B şişelerine 0.1 ml ilave edildi. GI 500-800 olan besiyerinden de 0.1 ml ilaç ilave edilmiş besiyerlerine eklendi.(GI 800-999 arasında olanlar 1:1 oranında dilüe edildikten sonra eklendi) Üremeyi kontrol etmek amacıyla herhangi bir ilaç içermeyen kontrol Bactec 12B şişesi (C=0) kullanıldı. Bu şişeye de kültür örneğinden 0.1 ml eklendi. Ayrıca dirençli/duyarlı ayırımında kullanabilmek için, C=100 adı verilen ikinci bir Bactec 12B kontrol şişesi kullanıldı. Kontrol C=100'ü hazırlamak amacı ile, yüz kat dilüe bakteri süspansiyonu elde etmek gerekmektedir. Bu amaçla, içinde 9.9 ml dilüsyon sıvısı bulunan şişeye yukarıda sözü edilen kültür örneğinden 0.1 ml konmuş

ve vortekslenmiştir. Hazırlanan bu bakteri süspansiyonundan 0.1 ml bakteri süspansiyonu alınarak, içinde herhangi bir antitüberküloz ilaç bulunmayan C=100 kontrol Bactec 12B şişesine inoküle edilmiştir. Şişeler 37°C'de karanlıkta inkübe edilmiş ve her gün aynı saatte BACTEC 460 cihazında okutulmuştur. C=100 kontrol şişesinde GI'ı 30 ve üzerine ulaşınca test sonlandırılmış, kontrol ve ilaç içeren şişelerin, bir gün önceyle karşılaştırarak, GI farklılıkları (Δ GI) hesaplanmıştır. Kontrol C=100 şişesinin Δ GI > ilaçlı şişenin Δ GI=duyarlı, C=100 şişesinin Δ GI<ilaçlı şişenin Δ GI =dirençli olarak belirlenmiştir. (68)

GenoType Mycobacteria Direct Test (GTMD) (Versiyon 4) (Hain Lifescience, Nehren,Germany): *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. tuberculosis* complex üyelerini kısa sürede tanımlamak için çalışıldı. Kansız Homojenize-dekontamine edilmiş 64 balgam örneği işleme alındı. Testin prosedürü 3 adımdan oluşmaktadır:

- 1.Manyetik boncuk yakalama yöntemiyle gerçekleştirilen RNA izolasyonu
- 2.NASBA reaksiyonuyla Amplifikasyon
- 3.Ters hibridizasyon

Moleküler yöntemlerde sık karşılaşılan kontaminasyon ve sonucunda yalancı pozitif sonuçları engellemek için çalışma ortamı %10 sodyum hipokloridle silindi.

GenoType Mycobacteria Direct Test Kit İçeriği :

Türe özgü problemlerle kaplı membran stripleri

MB: Manyetik Boncuk

BIN: Binding Buffer

LB: Lizis Buffer

BB: Boncuk Buffer

ICR: İnternal Kontrol DNA

EDB: Enzim Dilüsyon Buffer

EML:Liyofilize Haldeki Enzim Miksi , 44 µl EDB ile çözülür ve en az 15 dk oda sıcaklığında bekletilir.

PC-RNA: Pozitif kontrol RNA, (Çözüldükten sonra 2-8 °C'de saklanmalıdır.)

CRB: Kontrol RNA Buffer

PNM^D: Primer Nükleotid Miks + DMSO

PO: Parafin yağı

DMSO: Dimetilsülfoksit

X-DEN: Denatürasyon sıvısı. Kullanıma hazır

HYB: Hibridizasyon sıvısı. Kullanıma hazır

X-STR: Stringent yıkama solüsyonu. Kullanıma hazır

X-RIN: Durulama sıvısı. Kullanıma hazır

CON-C: Konsantre konjugat. Seyreltilerek kullanılır

CON-D: Konjugat dilüenti

SUB-C: Konsantre substrat. Seyreltilerek kullanılır

SUB-D: Substrat dilüenti

Testte Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması: %96 ve %70'lik etanoller hazırlandı

LB: Önceden en az 20 dk 37 °C'de ön inkübasyon yapıldı, kullanmadan önce çökelti olup olmadığı kontrol edildi, eğer varsa alt-üst edilip çökelti çözdürüldü.

ICR: Liyofilize haldeki İnternal Kontrol RNA, Kontrol RNA Buffer (CRB) ile çözüldü. Liyofilize ICR içine 60 µl CRB eklendi ve vortekslendi. (30 izolasyon için yeterli)

BB / ICR Miks: :Her bir örnek için karışım, 100 µl BB + 2 µl çözünmüş ICR ile hazırlandı ve vortekslendi

PC-RNA: Liyofilize haldeki PC RNA CRB ile çözüldü. Her bir PC RNA 15 µl CRB ile sulandırıldı ve vortekslendi.(Karışım 3 izolasyon için yeterlidir). Her bir pozitif kontrol için çözünmüş 5 µl PC-RNA + 500 µl Grade Water ile sulandırıldı ve vortekslendi.

MB / BIN Miks: Her bir örnek için 33 µl MB + 220 µl BIN hazırlandı. Pipetleyerek karıştırıldı.

PNM^D: Amplifikasyona başlanıldığında her bir reaksiyon için 11,5 µl PNM + 3,5 µl DMSO eklenip vorteklenerek hazırlandı.

EML: Ekstraksiyon işleminin 85 °C'deki 20 dakikalık inkübasyon aşamasında Liyofilize Haldeki Enzim Miksi (EML), 44 µl EDB ile dilüye edildi (8 reaksiyonluktur). Enzim kesinlikle vortekslenmez. İyice çözünmesi için 15 dk oda sıcaklığında bekletildik sonra kullanıma kadar +2-8 °C'ye kaldırıldı. (Kalan miks - 20 °C'de 4 hafta saklanabilir.

Testin yapılışı:

1.RNA İzolasyonu:

- Örnek sayısına göre MB/BIN miksi hazırlandı (MB kullanılmadan önce vortekslendi) ve 1,5 ml özel kapaklı tüplere her bir hasta için 230 µl miks pipetlendi ve üzerine dekontamine edilmiş örneklerden 700µl ilave edildi. Pipetle al-ver yapıldı ve oda sıcaklığında 15 dk bekletildi.
- Tüpler manyetik separatore yerleştirildi, manyetik çubuk mıknatıslar üstte olacak şekilde(pozisyon A) sürüldü ve 2 dakikalık İnkübasyon sonunda süpernatant pipetle pellete dokunmadan dikkatlice uzaklaştırıldı.
- Manyetik çubuk geri çekildi ve her bir tüpe 50 µl (önceden en az 20 dk 37°C'ye ısıtılmış) LB pipetlendi (aldı verdi yapılıır). 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra üzerine 150 µl %96'lık etanol ilave edildi, tüpler vortekslendi ve 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Manyetik çubuk tekrar sürüldü (poz A) ve 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda separator birkaç kez alt-üst edildikten sonra 1 dk tekrar inkübe edildi. Son olarak süpernatant dikkatlice çekildi. Magnetik çubuk çıkartıldı, tüplere 1'er ml %70'lik etanol pipetlendi ve tüpler vortekslendi.
- Manyetik çubuk sürüldü (poz A) ve 2 dk inkübasyondan sonra separator birkaç kez alt-üst edildikten sonra 1 dk oda sıcaklığında tekrar bekletildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Kapaklar kapatılmadan süpernatantın tamamının buharlaşması için 5 dk oda sıcaklığında bırakıldı ve kalan sıvı tekrar pipetle çekildi
- Etanol tamamen uzaklaştıktan sonra manyetik çubuk çekildi ve her bir tüpe 100 µl BB/ICR miksi pipetlendi, al-ver yapıldıktan sonra 20 dk 85 °C'de kapaklar açık olarak inkübe edildi.
- Tüpler separatore yerleştirildi ve manyetik çubuk mıknatısları altta olacak şekilde (pozisyon B) sürüldü ve 2 dk inkübe edildi. Sonuç olarak elde ettiğimiz RNA'lar süpernatanta geçtiğinden süpernatant amplifikasyon için ayrı bir tüpe alındı. (Hemen çalışılmıyacaksa -20 °C'de 3 gün saklanabilir)

2.Amplifikasyon (NASBA Reaksiyonu):

0,2'lik PCR tüplerine 15 µl PNM^D + 10 µl RNA + 20-30 µl PO (parafin yağı) pipetlendi ve Thermocycler cihazına amplifikasyon konur. 3. adıma gelindiğinde

tüplerin içine parafin yağının altına dikkatlice 5'er µl önceden hazırlanmış olan Enzim Miksi pipetlendi ve tüpler cihaza geri kondu. (Amplifikasyon ürünü hemen çalışılmayacaksa -20°C'de 3 gün saklandı.)

Sıcaklık	65 °C	41 °C	41 °C
Süre	8 dk	5 dk	60 dk
Döngü	1	1	1

3.Ters Hibridizasyon:

Auto-Lipa Cihazıyla otomatize olarak yapıldı. Çalışmadan önce cihaza Fill sistem ve Auto Clean işlemleri uygulandı. Uygun program seçilerek ön ısıtma işlemi başlatıldı.(yaklaşık 45 dk). Bu arada Hibridizasyon (HYB) ve Stringent (X-STR) solüsyonları cihazın ısıtıcı bölümüne yerleştirildi. (Bu solüsyonlar kullanılmadan önce 37-50 °C'ye getirildi)

Yeterli miktardaki konjugat ve substratın uygun bufferları ile 1/100 oranında seyreltmeleri yapılarak hazırlandı. Sistem hazır hale geldiğinde çalışılacak örnek sayısı belirlendi ve program başlatıldı.

Her bir kuyucuğunun üst kısmına 20 µl Denatürasyon sıvısından (X-DEN), üzerine ise amplifikasyon ürünlerinden 20 µl pipetlendi. Al-ver yaparak denatürasyon sıvısı ile amplifikasyon ürününün karışması sağlandı ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda programa devam edildi ve cihaz her bir kuyucuğa 1 ml önceden ısıtılmış Hibridizasyon sıvısı (HYB) dağıtarak hibridizasyonun gerçekleşmesi sağlandı.

Bu sırada bir pens yardımıyla kuyucuklara stripler yerleştirildi. Stripler yerleştirilirken renkli kısım yukarıda olacak şekilde kondu ve tamamen sıvıya batmış olmaları sağlandı. 50 °C'de 30 dakika inkübasyon başlatıldı.

Cihaz inkübasyon sonrasında kuyucukları boşaltılarak üzerlerine önceden ısıtılmış Stringent yıkama solüsyonundan (X-STR) 1 ml aktardı. 50 °C'de 15 dakika inkübe edildi.

Bu sırada aşamasında temiz bir tüpte yeterli miktarda Konsantre konjugatın (CON-C), Konjugat dilüenti (CON-D) ile 1/100 oranında seyreltilerek hazırlandı.

Sürenin sonunda kuyucuklardaki tüm sıvı cihaz tarafından çekildi ve her bir kuyucuğa 1 ml seyreltilmiş Konjugat solüsyonu eklendi. 25 °C'de 30 dakika inkübe edildi.

Bu inkübasyon aşamasında temiz bir tüpte yeterli miktarda Konsantre substratın (SUB-C), Substrat dilüenti (SUB-D) ile 1/100 oranında seyreltilerek hazırlandı. (ışıkta etkilendiği için substratın karanlıkta saklandı.

Sürenin sonunda kuyucuklardaki tüm sıvı cihaz tarafından çekildi ve her bir kuyucuğa 1 ml Durulama sıvısı (X-RIN,) kondu. 1 dakika çalkalandı ve kuyucuklar boşaltılarak X-RIN ile yıkama işlemi tekrar edildi.

Sürenin sonunda kuyucuklardaki tüm sıvı cihaz tarafından çekildi. Kuyucuklara 1 ml distile su kondu ve stripler 1 dakika yıkandı.

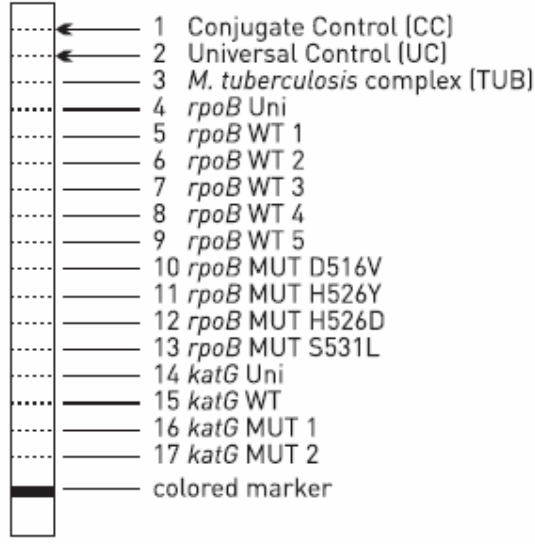
Sürenin sonunda kuyucuklardaki tüm sıvı cihaz tarafından çekildi. Kuyucuklara 1 ml seyreltilmiş substrat kondu. Oda sıcaklığında karanlıkta 5 dakika inkübe edildi. Substratın fazlalığının uzaklaştırılması için stripler 2 kez distile su ile yıkandı. Stripler kuyucuklardan çıkarılarak iki kurutma kağıdı arasında kurutuldu ve kitin içinden çıkan değerlendirme kartıyla stripler yorumlandı.

İlaç direncinin moleküler yöntemle saptanması: Bu amaçla çalışmamızda revers hibridizasyon esasına dayalı, DNA strip teknolojisi ile hazırlanan ticari bir ürün olan GenoType Mycobacteria Drug Resistance (MTBDR) (Hain Lifescience GMBH, Nehren, Germany) kullanılmıştır. Bu testle RİF ve İNH ilaçlarına karşı oluşan mutasyonların bir kısmını tespit etmek mümkündür. Testin aşamaları:

Kültür ortamında elde edilen ve direnç geni araştırılacak her izolat için PCR ile çoğaltma işlemi gerçekleştirildi.

Takiben dirençten sorumlu gen bölgelerine ait DNA molekülleri nitrosellülöz stripler üzerinde bulunan dirençten sorumlu gen bölgesine ait duyarlı ve mutant dizileri içeren probler ile hibridizasyona bırakıldı.

Hibridizasyon sonrası mutant dizilere bağlanma durumu (bant oluşumu) dirençli olarak yorumlandı.



Şekil: 3.1. Strip üzerinde bulunan prob bölgeleri

GenoType MTBDR Kit İçeriği:

Türe özgü problemlerle kaplı membran stripleri

PN karışımı (PNM): Primer nükleotid karışımı

Rinse Solüsyonu (RIN): <1% NaCl, <1 % anyonik tensid

DEN: Denatürasyon sıvısı. Kullanıma hazır

HYB: Hibridizasyon sıvısı. Kullanıma hazır

STR: Stringent yıkama solüsyonu. Kullanıma hazır

RIN: Durulama sıvısı. Kullanıma hazır

CON-C: Konsantre konjugat. Dilüye edilerek kullanılır

CON-D: Konjugat dilüenti

SUB-C: Konsantre substrat. Dilüye edilerek kullanılır

SUB-D: Substrat dilüenti içermektedir

a.DNA İzolasyonu:

Sıvı besi yerinden (BACTEC 12B): direkt 1 ml kültür alındı ve 15 dakika

10000 xg'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve bakteri pelleti 200µl distile su içerisinde vorteksenerek çözüldü. (Bactec 12B'de üremeyen fakat LJ besiyerinde

üreyen örneklerde besiyerinden bir miktar koloni alındı ve 300 µl distile su içerisinde vortekslenerek çözüldü).

Yukarıda ki şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonları 95 °C'de 20 dakika ısı bloğunda ya da kaynar su banyosunda inkübe edildi ve sonra 15 dakika ultrasonik su banyosunda sonike edildi.

Örnekler 5 dakika max. hızda santrifüj edilerek süpernatandan 5 µl alındı ve direkt PCR da kullanıldı. (Hemen çalışılmayan örnekler için süpernatatan başka bir tüpe aktarılarak -20 °C'de saklandı)

b.Amplifikasyon (Çoğaltma): PCR master miksi temiz bir odada aşağıdaki gibi hazırlandı ve de örnekler farklı bir yerde misklere eklendi.

Reaktif	Miktar
PN Miks (PNM)	35 µl
10x PCR Buffer	5 µl
MgCl ₂	5 µl
TaqGold Polymerase	0.2 µl
Örnek	5 µl
<i>Toplam PCR reaksiyon Hacmi =</i>	50 µl

PCR Protokolü

95 °C ----- 05:00 dakika

95 °C ----- 00:30 saniye

58 °C ----- 02:00 dakika

} 10 Döngü

95 °C ----- 00:25 saniye

53 °C ----- 00:40 saniye

70 °C ----- 00:40 saniye

} 20 Döngü

70 °C ----- 08:00 dakika

c.Hibridizasyon: Auto-Lipa Cihazıyla otomatize olarak yapıldı. Çalışmadan önce cihaza Fill sistem ve Auto Clean işlemleri uygulandı. Uygun program seçilerek ön ısıtma işlemi başlatıldı.(yaklaşık 45 dk). Bu arada Hibridizasyon (HYB) ve Stringent (STR) solüsyonları cihazın ısıtıcı bölümüne yerleştirildi. (Bu solüsyonlar kullanılmadan önce 37-45 °C'ye getirildi.)

CON-C ve SUB-C (+4 °C'de korunur) dışında ki diğer tüm solüsyonlar oda sıcaklığında bekletilerek ısıtıldı. Yeterli miktardaki konjugat ve substratın uygun bufferları ile 1/100 oranında seyreltmeleri yapılarak hazırlandı.(Dilüye Substrat oda sıcaklığında ışıktan korumalı olarak 4 hafta saklanabilir) Her bir örnek için:

10 µl CON-C + 1 ml (1000 µl) Sulandırma solüsyonu (CON-D)

10 µl SUB-C + 1 ml (1000 µl) Sulandırma solüsyonu (SUB-D)

Sistem hazır hale geldiğinde çalışılacak örnek sayısı belirlendi ve program başlatıldı. Her kuyucuğun üst kısmına 20 µl Denatürasyon sıvısı (DEN), üzerine ise amplifikasyon ürünlerinden 20 µl pipetlendi. Pipetlenerek denatürasyon sıvısı ile amplifikasyon ürününün karışması sağlandı ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda programa devam edildi ve cihaz her bir kuyucuğa 1 ml önceden ısıtılmış hibridizasyon sıvısı (HYB) dağıtarak hibridizasyonun gerçekleşmesi sağlandı.

Bu sırada bir pens yardımıyla kuyucuklara stripler yerleştirildi. Stripler yerleştirilirken renkli kısım yukarıda olacak şekilde kondu ve tamamen sıvıya batmış olmaları sağlandı. 45 ± 1 °C'de 30 dakika çalkalanarak inkübe edildi.

Sürenin sonunda kuyucuklardaki tüm sıvı cihaz tarafından çekildi ve her bir kuyucuğa 1 ml STR (Stringent Wash Solution) solüsyonu eklendi ve 15 dakika 45 ± 1 °C'de çalkalanarak inkübe edildi.

Sürenin sonunda kuyucuklardaki tüm sıvı cihaz tarafından çekildi ve her bir kuyucukta ki strip üzerine bir kez 1ml RIN (Rinse Solution) solüsyonu eklenerek 1 dakika çalkalanarak yıkandı.

Daha sonra bu sıvı önceki gibi boşaltıldı. Kuyucuklar da ki striplerin üzerine 1 ml daha önceden sulandırılmış Conjugate eklendi ve 30 dakika çalkalanarak inkübe edildi.

İnkübasyon sonrası Conjugate dökülerek boşaltıldı ve her bir strip 2 kez 1 ml RIN (Rinse Solution) 1 kez de 1 ml distile su ile 1'er dakika çalkalanarak yıkandı.

Her bir strip üzerine 1 ml daha önceden sulandırılmış Substrate solüsyonu eklendi ve karanlıkta test koşullarına bağlı olarak (oda sıcaklığı gibi) bantların oluşmasına göre 3 ile 20 dakika arasında çalkalamadan inkübe edildi.

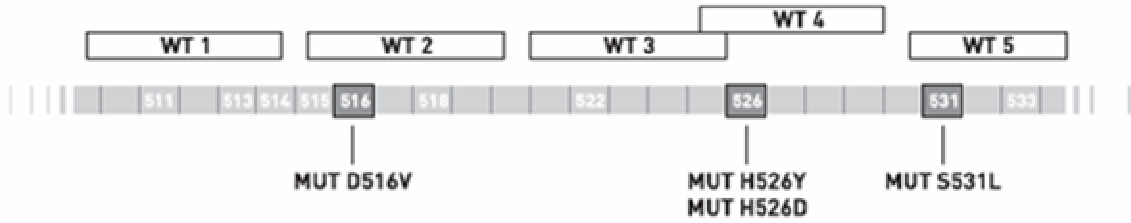
Bantların oluştuğu gözlemlendiğinde stripler iki kez distile su ile yıkandı ve işlem sonlandırıldı. Stripler kuyucuklardan alınarak kurutma kağıdının arasına konularak kurutuldu ve değerlendirme aşamasına geçildi

d.GenoType MTBDR sonuç değerlendirme: Çalışmanın kabul edilebilir olması için aşağıdaki koşulların sağlanması gerekmektedir. Oluşan bantların yorumu.

- 1) Konjugat kontrol bandı: strip üzerinde konjugat bağlanma ve substrat reaksiyonunun verimliliğini göstermektedir. Bu bandın oluşması gerekmektedir.
- 2) Universal kontrol bandı: Bilinen tüm Mikobakterileri ve yüksek G+C içeriği olan Gram pozitif bakterileri tanımlar. Band şiddeti Universal kontrol band şiddeti kadar veya daha güçlü olan band patternleri değerlendirmeye alınır.
- 3) *M. tuberculosis* complex bandı: *M. tuberculosis* complex üyelerinden oluşan amplikonların varlığında band patterni oluşur. Bu bölgede band oluşmamışsa test edilen bakteri *M. tuberculosis* complex'e ait değildir ve bu sistemle değerlendirilemez.
- 4) *rpoB* ve *katG*: İlgili gen bölgelerini (*rpoB* uni ve *katG* uni) göstermektedir. Vahşi (Wild) tip bölgesinde oluşan bandlar duyarlılığı, mutasyon bölgelerinde oluşan bandlar ilaç direncini belirlemektedir. Vahşi tip bölgesinde çıkmayan herhangi bir pattern çalışılan örneğin dirençliliğini göstermektedir.
- 5) *rpoB* problemleri: *rpoB* Uni bölgesi, genin *rpoB*'ye özgü bölgesini göstermektedir ve her zaman bu bölgede band oluşmalıdır. Beş farklı *rpoB* vahşi gen bölgesi (*rpoB* WT 1-5) ve dört adet mutant (*rpoB* MUT: D516V, H526Y, H526D ve S531L) bölgesi bulunmaktadır. Band şiddeti Universal kontrol band şiddeti kadar veya daha güçlü olan band patternleri değerlendirilmeye alınır.

İlgili bölgeler *rpoB* vahşi tip veya mutant geni belgelemektedir. Vahşi tip bölgesindeki tüm bandlar oluştuğunda çalışılan gen bölgesinde mutasyon yok demektir. Eğer mutasyon varsa, ilgili ampikon vahşi tip probuna bağlanamayacaktır. En azından bir vahşi tip bölgesinde band oluşmaması çalışılan örnekte rifampicin direnci olduğunu göstermektedir.

Rif direncine sebep olan ve sık gözlenen bu dört mutasyondan herhangi biri saptandığında (*rpoB* MUT: D516V, H526Y, H526D ve S531L), ilgili vahşi tip bölgesinde band oluşmaması gerekmektedir.



Şekil 3.2: Vahşi tip ve mutant gen bölgesine ait prob bölgeleri:

Aşağıdaki özel durumlara dikkat edilmelidir.

- 6) *katG* problemleri: *katG* Uni bölgesi, genin *katG*' ye özgü bölgesini göstermektedir ve her zaman bu bölgede band oluşmalıdır. *katG* vahşi tip probu 315. pozisyondaki INH direnç bölgesini saptamaktadır. İki *katG* mutant probu, *katG* geninde sıklıkla rastlanan INH direnç mutasyonlarını saptamaktadır. Band şiddeti Universal kontrol band şiddeti kadar veya daha güçlü olan band patternleri değerlendirmeye alınır.

İlgili bölgeler *katG* vahşi tip veya mutant geni belgelemektedir. Vahşi tip bölgesinde band oluştuğunda, diğer iki mutant bölgede band gözlenmeyecektir. Çalışılan gen bölgesinde mutasyon yok demektir ve INH duyarlıdır. Eğer mutasyon varsa, ilgili ampikon vahşi tip probuna bağlanamayacaktır. Vahşi tip bölgesinde band oluşmaması çalışılan örnekte INH direnci olduğunu göstermektedir.

Eğer direnç bu iki INH mutasyon bölgesinden (S315T1/2) kaynaklanıyorsa, vahşi tip bölgesinde band oluşmayacak ancak mutant iki bölgede (*katG* MUT1-MUT2) band gözlenecektir. Eğer INH direnci, iki mutant gen bölgesinden değil de vahşi tip gen bölgesinin olduğu yerden kaynaklanıyorsa ne vahşi tip prob ne de iki mutant prob bölgesinde band gözlenmeyecektir.

4.BULGULAR

Çalışma kapsamında her hastadan sadece bir balgam örneği alındı. Tüberküloz yönünden incelenen 67 balgam örneği; iki farklı direkt mikroskopi yöntemi ile (karbolfuksin ve floresan), iki farklı kültür yöntemiyle (Löwenstein-Jensen + BACTEC 12B) ve GenoType Mycobacteria Direct Test (GTMD) yöntemiyle incelendiler. Kültürde üreyen örneklerde Bactec 460 TB sisteminde ve GenoType MTBDR testi ile İNH ve RIF direnci arandı. Çalışılan testlerin kalite kontrolü *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177 standart suşuyla yapıldı. Çalışılan tüm örneklerin test sonuçları Tablo 4.1’de görülmektedir.

Tablo 4.1: Çalışılan tüm örneklerin yöntemlere göre test sonuçları

No	K/E	Yaş	Ted alıyor mu?	DİREKT MİKROSKOPİ				KÜLTÜRLER			MTBD	DUYARLILIK			
				Kinyoun		Floresan		Bactec	LJ	NAP		Bactec		MTBDR	
				Direkt	H/D	Direkt	H/D					İNH	RİF	İNH	RİF
1	K	50	H	N	1	1	3	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
2	E	53	H	N	N	N	N	N	N		N				
3	E	45	H	N	3	1	3	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
4	E	78	H	N	N	N	N	N	N		N				
5	E	49	H	3	3	4	4	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
6	E	65	H	N	N	N	N	N	N		N				
7	K	36	H	N	N	N	N	N	N		N				
8	E	55	E	1	1	1	2	+	N	+	MTBC	S	S	S	S
9	E	24	E	N	2	2	3	+	N	+	MTBC	R	R	R	R
10	E	26	E	3	3	3	4	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
11	K	25	H	3	3	3	4	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
12	E	71	H	3	3	3	4	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
13	K	42	H	3	4	4	4	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
14	E	42	H	2	3	3	4	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
15	E	40	E	2	3	3	4	N	N		MTBC				
16	E	52	H	2	3	3	4	+	+	+	MTBC	R	R	S	S
17	E	35	H	3	4	3	4	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
18	E	51	H	3	3	3	4	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
19	E	46	H	3	4	3	4	+	N	+	MTBC	S	S	S	S
20	K	47	H	4	4	4	4	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
21	E	34	H	3	4	3	4	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
22	E	64	H	3	4	3	4	+	N	+	MTBC	S	S	S	S
23	K	48	H	1	2	2	3	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
24	K	42	H	2	3	3	4	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
25	E	53	H	4	4	4	4	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
26	E	72	E	N	N	N	N	N	N		MTBC				
27	K	44	H	N	1	2	3	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
28	E	53	H	1	2	3	4	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
29	E	25	H	N	1	2	2	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
30	E	29	H	2	3	4	3	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
31	K	31	H	2	2	3	4	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
32	E	21	E	1	1	3	3	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
33	E	31	H	3	4	4	4	+	+	+	MTBC	R	S	S	S
34	E	50	H	1	1	1	3	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
35	E	42	E	N	2	2	2	N	N		MTBC				
36	E	58	H	1	2	2	4	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
37	K	38	H	2	2	3	3	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
38	E	18	E	N	N	1	1	N	N		MTBC				
38	K	45	H	N	N	N	N	N	N		N				
40	E	37	H	N	1	2	2	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
41	K	19	H	N	1	1	2	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
42	E	80	H	N	N	N	N	N	N		N				
43	K	19	E	N	N	N	1	N	N		MTBC				
44	K	70	E	N	N	N	N	N	N		MTBC				
45	E	35	H	N	N	N	1	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
46	E	56	H	N	N	N	N	N	N		N				
47	E	60	H	N	N	N	1	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
48	E	43	H	N	N	N	N	N	N		N				
49	K	17	H	N	N	1	1	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
50	E	37	H	N	1	2	3	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
51	K	31	H	N	N	1	1	+	+	+	MTBC	R	R	R	R
52	E	42	H	N	N	1	2	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
53	K	18	E	N	N	N	N	+	+	+	MTBC	S	R	S	R
54	E	50	E	N	N	N	1	N	N		N				
55	E	38	H	N	N	N	N	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
56	E	37	H	N	N	1	2	+	+	+	N	S	S	S	S
57	K	21	H	3	4	4	4	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
58	E	38	H	2	3	3	4	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
59	E	60	H	1	1	2	4	+	+	+	MTBC	S	S	S	S
60	K	60	H	N	N	1	1	+	+	+	MTBC	R	S	R	S
61	E	50	H	N	N	N	N	N	N		N				
62	E	74	H	N	N	N	N	N	N		N				
63	E	56	H	N	N	N	N	N	N		N				
64	E	48	H	N	N	N	N	N	N		N				

İncelenen 67 örnekten 2 tanesinde kontaminasyona rastlandığı için çalışmadan çıkarıldı. Yayma ve MTBD testinde pozitiflik olduğu halde kültürde üreme saptanmayan bir hastanın, tedavi alıp almadığı ile ilgili kesin bilgiye ulaşılamadığı için çalışmadan çıkarıldı.

Örneklerin alındığı hastaların 19 tanesi kadın, 45 tanesi erkekti. Yaş dağılımı 18-80 arasında değişmekteydi. (ortalama 44.15) Çalışmaya alınan 64 örneğin 12 tanesi tüm yöntemlerle negatifken 52 örnekte en az bir yöntemle pozitiflik saptandı. Bunların 48'i direkt mikroskopik inceleme ile pozitif olarak değerlendirildi. Bactec12B'de 45 örnekte üreme saptanırken, L-J besiyerinde 41 örnekte üreme saptandı. MTBD testinde 50 örnek pozitif olarak değerlendirildi. Kültürde üreyen 45 örnekten 4'ünde RİF, 3'ünde İNH direnci saptandı.

Çeşitli çalışmalarda ve Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) önerisi doğrultusunda mikobakterilerin kesin tanısı için örneklerin bir katı besiyeri + bir sıvı besiyeri ortamlarına kombine ekilmesi altın standart olarak belirtilmiştir.(43,44,55) Çalışmamızda bu öneri doğrultusunda Bactec 12B besiyeri + LJ besiyeri kültür kombinasyonu altın standart kabul edilerek hesaplanan diğer yöntemlerin duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değerlerini (PPD) ve negatif prediktif değerlerini (NPD) her yöntem için karşılaştırarak değerlendirdik.

Aktif tüberküloz tanısında ARB saptanması genellikle ilk basamak olarak kabul edilmektedir. Fakat boyamada kullanılan yöntemler arasında duyarlılık ve özgüllük farkı olduğu bilinmektedir.(45)

Tablo 4.2'de görüldüğü gibi direkt mikroskopik inceleme ile 64 örneğin pozitif saptanan 48'i floresan boyama ile pozitifken karbolfuksin ile 38'i pozitif. 10 örnek sadece floresan boya ile pozitifken karbolfuksin boya ile negatif saptandı. Floresan boya ile saptanamayıp karbolfuksin ile pozitif saptanan örnek olmadı.

Tablo 4.2: Floresan boyamaya göre karbolfuksin boyamanın değerlendirilmesi

	Floresan boyama +	Floresan boyama -	Toplam
Karbolfuksin Boyama +	38	-	38
Karbolfuksin Boyama -	10	16	26
Toplam	48	16	64

Duyarlılık: %79

PPD: %100

Özgüllük: %100

NPD: %62

Floresan boyama ile kültür sonuçlarını karşılaştırdığımızda (Tablo 4.3) kültürde üreyen 45 örneğin 43'ü floresan boya ile pozitifken 2 örnek negatifdi. Kültürde üremeyen 19 örneğin 14'ü floresan boya ile negatifken, 5 örnek pozitifdi. Bu 5 hastanın 4'ü tedavi almaktaydı.

Tablo 4.3: Kültür ile floresan boyama yönteminin karşılaştırılması

Kültür (LJ ve/veya Bactec)			
	+	-	
Floresan boyama +	43	5	48
Floresan boyama -	2	14	16
	45	19	64

Duyarlılık: % 96

PPD: % 90

Özgüllük: % 74

NPD: % 88

Karbolfuksin boyama ile kültür sonuçlarını karşılaştırdığımızda (Tablo 4.4) kültürde üreyen 45 örneğin 36'sı karbolfuksin boya ile pozitifken 9 örnek negatifdi. Kültürde üremeyen 19 örneğin 17'si karbolfuksin boya ile negatifken, 2 örnek pozitifdi. Bu 2 hasta da tedavi almaktaydı. Çalışmamızda 64 örneğin direkt mikroskopik inceleme sonuçları ile kültür (Bactec 12B ve/veya LJ) sonuçlarını değerlendirildiğimizde antitüberküloz tedavi alan ve almayan hastalar arasında yukarıda belirtildiği gibi farklılıklar olduğu görüldü.

Tablo 4.4: Kültür ile karbolfuksin boyama yönteminin karşılaştırılması

Kültür (LJ ve/veya Bactec)			
	+	-	
Karbolfuksin +	36	2	38
Karbolfuksin -	9	17	26
Toplam	45	19	64

Duyarlılık: % 80 PPD: % 95
 Özgüllük: % 90 NPD: % 65

MTBD test sonuçları direkt mikroskopik inceleme ile karşılaştırıldığında Tablo 4.5’de görüldüğü gibi 64 örneğin; 50 örnek MTBD test ile pozitif saptanırken, bunların karbolfuksin ile 38’i; floresan ile 47’si pozitif saptandı. MTBD ile negatif saptanan örneklerden hiçbiri karbolfuksin ile pozitiflik göstermezken sadece 1 tanesi floresan ile pozitifdi. Karbolfuksin ile negatif olarak değerlendirilen 12 örnek MTBD test ile pozitif saptandı, 14 örnek her iki yöntemle de negatifdi. Floresan boyama ile negatif olarak değerlendirilen 4 örnek MTBD test ile pozitifken, 12 örnek her ikisi ile negatifdi.

Tablo 4.5: Direkt mikroskopik inceleme ve MTBD test sonuçları

	Karbolfuksin yöntemi		Floresan yöntemi	
	+	-	+	-
MTBD +	38	12	47	4
MTBD -	-	14	1	12
	38	26	48	16
Toplam	64		64	

Duyarlılık: % 76 PPD: % 100 Duyarlılık: %92 PPD: % 96
 Özgüllük: %100 NPD : % 54 Özgüllük: % 86 NPD: % 75

Çalışmamızda örnekler bir katı bir sıvı olmak üzere iki besiyerine ekildi. Üremelerini değerlendirdiğimizde 64 örneğin 45'inde Bactec 12B'de üreme saptanırken 19'unda üreme olmadığı görüldü. (Tablo 4.6) LJ besiyerine bakıldığında 41 örnekte üreme saptanırken 23 örnekte üreme görülmedi. Bactec 12 B'de üreyen 45 örneğin 4'ünde LJ besiyerinde üreme olmadı. 41 örnek her iki besiyerinde de üredi. 19 örnekte her iki yöntemle de üreme görülmedi. LJ' görülen tüm üremeler koloni morfolojisi ve pigment oluşumu açısından incelendiğinde *M. tuberculosis* complex ile uyumluydu. (Açık krem renkli, kuru, ekmek kırığı görünümünde koloniler) Bactec 12B besiyerinde GI ~100 olduğunda yayma yapılarak karbolfuksin ile boyandığında üreyen tüm kolonilerin kord faktör oluşturduğu görüldü bu da üreyen mikobakterinin *M. tuberculosis* complex olduğunu düşündürdü. Yine Bactec 450 TB sisteminin bir parçası olan NAP testi uygulandığında tüm üremeler pozitif olarak yani *M. tuberculosis* complex'le uyumlu olarak değerlendirildi.

Tablo 4.6: Bactec 12B ve LJ besiyerlerinde üremelerin değerlendirilmesi

	Üreme (Bactec) +	Üreme (Bactec) -	Toplam
Üreme (LJ) +	41	-	41
Üreme (LJ) -	4	19	23
Toplam	45	19	64

Duyarlılık: %91

PPD: %100

Özgüllük: %100

NPD: %83

Çalışmamızda çeşitli testlerle değerlendirdiğimiz 64 örneğin alındığı hastalar değerlendirildiğinde antitüberküloz tedavi alan ve almayanlar arasında farklılıklar olduğu görüldü. (Tablo 4.7) Çalışılan 64 örneğin 52'sinin tedavi almayan tüberküloz şüpheli hastalardan alındığı görüldü. Bu 52 hastanın 40'ında kültürde üreme görüldü. Üreme görülen 40 örneğin 39'u MTBD test ile pozitifken 1'i negatifdi. Üreme görülen ve MTBD pozitif olan bu bir örneğin yayması pozitif olarak değerlendirildi. Kültürde üremeyen 12 örneğin MTBD testi negatifdi ve bu örneklerin yaymaları da negatifdi

Tablo 4.7: Tedavi almayan hastaların testlere göre dağılımı

	Kültür + (bactec ve/veya LJ)	Kültür - (bactec ve/veya LJ)
MTBD +	39	-
MTBD -	1	12
Toplam (52)	40	12

Duyarlılık %97

PPD %100

Özgüllük %100

NPD %92

Çalışılan 64 örneğin 12'sinin antitüberküloz tedavi alan hastalardan alındığı görüldü. (Tablo 4.8) Bu 12 hastanın 5'inde kültürde üreme görüldü. Üreme görülen 5 örneğin hepsi MTBD testi ile pozitifken negatif olan yoktu. Üreme görülen ve MTBD pozitif olan bu 5 örneğin 4'ünün yayması pozitifken 1'inin negatifdi. Kültürde üremeyen 7 örneğin 6'sının MTBD testi pozitifdi ve bu örneklerin 4'ünün yayması pozitif 2'sinin yayması negatifdi. 12 örneğin 9'u yayma pozitif 3'ü negatifdi. Bu 9 yayma pozitif örneğin 4'ü MTBD testi ve kültürle pozitifken, 4'ü MTBD ile pozitif, kültür negatifdi. Yayma pozitif 1 örnek ise hem kültür, hem de MTBD ile negatifdi. Yayma negatif 3 örneğin 1 tanesi kültür ve MTBD pozitifken, 2'si MTBD testi ile pozitifken kültürde üremedi. Her üç yöntemle negatif olan örnek yoktu.

Tablo 4.8: Tedavi alan hastaların testlere göre dağılımı

	Kültür + (Bactec ve/veya LJ)		Kültür - (Bactec ve/veya LJ)	
	MTBD(+)	MTBD(-)	MTBD(+)	MTBD(-)
Yayma(+) 9	4	-	4	1
Yayma(-) 3	1	-	2	-
Toplam (12)	5	-	6	1

Duyarlılık: %100

PPD: %45

Özgüllük: %14

NPD:%100

Ekim yaptığımız örneklerden 45 tanesinde üreme görüldü. Üreme görülen bu 45 örnekte direnç varlığının aranmasında klasik bir yöntem olan Bactec 12B besiyeri ve dirence neden olan mutasyonları saptamayı hedefleyen MTBDR uygulanarak İNH ve RİF direnci arandı. Tablo 4.9'da görüldüğü gibi 45 örneğin 41'i RİF'ne duyarlıken 4'ü dirençliydi.(%9) 45 örneğin 40'ı İNH'e duyarlıken 5'i dirençliydi. (% 11)

Tablo 4.9: İNH ve RİF direncinin örneklere göre dağılımı

	Duyarlı	Dirençli	Toplam
RİF	41	4	45
İNH	40	5	45

Dirençli örneklerin dağılımına baktığımızda 1 örnekte sadece RİF direnci (%2), 2 örnekte sadece İNH direnci (%4), 3 örnekte ise RİF + İNH direnci birlikte (%7)saptandı.(Tablo 4.10)

Tablo 4.10. Üreyen örneklerde saptanan direncin dağılımı

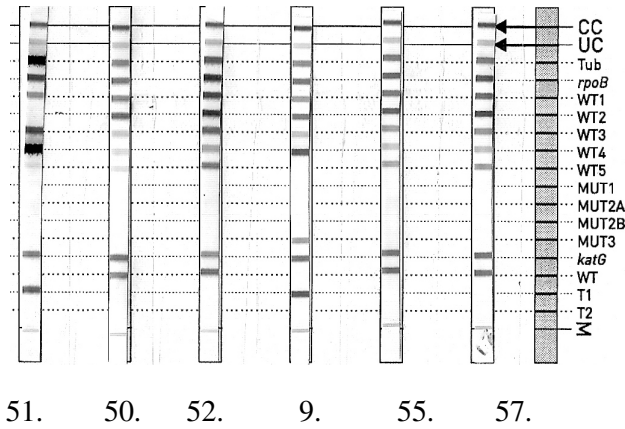
	Sayı	%
Sadece RİF direnci	1	2
Sadece İNH direnci	2	4
RİF + İNH direnci	3	7

İNH ve RİF direncini saptamada kullandığımız iki yöntemi birbiriyle karşılaştırdığımızda (Tablo 4.11) Bactec 12B'de RİF direni belirlenen 4 örneğin 1'inde MTBDR ile direnç saptanamadı. 4 dirençli suşun 3'ünde ise her iki yöntemle de direnç saptandı. Bactec 12B'de 5 İNH direnci belirlenen örneğin 2'sinde MTBDR ile direnç saptanamadı. 5 örneğin 3'ünde her iki yöntemle de direnç saptandı. Bactec 12B ile diren saptanmayan hiçbir örnekte MTBDR ile de direnç saptanamadı.

RİF direncini saptamada Bactec 12B ile MTBDR karşılaştırıldığında (Tablo 4.11) duyarlılık %75, Özgüllük %100, PPD %75, NPD % 97 olarak belirlendi. İNH direncini saptamada Bactec 12B ile MTBDR karşılaştırıldığında duyarlılık %60, Özgüllük %100, PPD %100, NPD % 95 olarak belirlendi.

Tablo 4.11: Direnç saptamada kullanılan iki yöntemin ilaçlara göre dağılımı

	Bactec +		Bactec -	
	MTBDR +	MTBDR -	MTBDR +	MTBDR -
RİF	3	1	-	41
İNH	3	2	-	40



Şekil 4.1. Çalışmamızdaki 6 örneğin GenoType MTBDR test stripleri

51.strip: WT 2 bandı kaybına bağlı RİF direnci + WT bandı kaybı ve T1 mutasyonuna bağlı İNH direnci

9.strip: WT5 bandı kaybı ve MUT3 bandı oluşumuna bağlı RİF direnci + WT bandı kaybı ve T1 mutasyonuna bağlı İNH direnci

50, 52, 55, 57. stripler: RİF+İNH direnci yok

5.TARTIŞMA

Geleneksel yöntemlerle laboratuvar tanısı zaman alıcı ve zahmetli olan mikobakteriyel enfeksiyonların erken tanı ve tedavilerinde güvenilir sonuçlar veren hızlı testlere gereksinim duyulmaktadır. Son yıllarda kullanımı giderek artan moleküler yöntemler mikobakterilerin klinik örnekten tanısında, tür düzeyinde tanımlanmasında, ilaç direncinin belirlenmesinde ve epidemiyolojik araştırmalarda kullanılmaktadır. Nükleik asit tabanlı testler, diğer enfeksiyon etkenlerinde olduğu gibi mikobakterilerde de özgül nükleik asit dizisinin, saptanabilecek düzeye gelinceye kadar çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Geleneksel yöntemlere göre daha hızlı tanı konulmasını sağlamakla birlikte bu testlerin klinik örnekte tüberküloz varlığının saptanmasında altın standart olan direkt bakı ve kültür kombinasyonu ile birlikte uygulanması önerilmektedir. (69)

Tanıda ilk basamak olan direkt mikroskopik inceleme uygulanması kolay, hızlı ve ucuz olmakla birlikte duyarlılığı düşüktür. Bir çok yayında yaymanın duyarlılığının %20-80 arasında değiştiği belirtilmektedir. Ayrıca saptanan ARB pozitif basilin hangi mikobakteri türüne ait olduğu belirlenemediği gibi, canlı ve ölü basil ayrımı da yapamamaktadır. Ayrıca yaymanın hazırlandığı örneğin tipi, yaymanın hazırlanma tekniği, kullanılan boyama yöntemi, yaymayı inceleyen kişinin deneyimi ve hazırlanan yayma sayısı duyarlılığı ciddi şekilde etkiler.(4, 28, 29)

Karbolfuksin boyamanın duyarlılığını ve özgülüğünü Albay ve ark. %57, %100; olarak bulmuştur.(70) Biz çalışmamızda H/D yaymaların direkt mikroskopik incelenmesinde karbolfuksin yönteminin duyarlılığını %80, özgülüğünü %90 olarak bulduk. Floresan yönteminin duyarlılığının karbolfuksin yöntemine göre daha yüksek olduğu bilinmektedir. Tarhan G. ve ark floresan yönteminin duyarlılığını ve özgülüğünü sırasıyla 74.8%, 88.5% olarak bulmuşlardır.(71) Biz kültürle kıyasladığımızda bu yöntemin duyarlılığını ve özgülüğünü sırasıyla %96, %74 olarak bulduk. Duyarlılığın yüksek olmasını aynı örnekten birden fazla yayma hazırlanmasına, özgülüğün düşük olmasını ise tedavi alan hastalarda görülen yayma pozitifliğine rağmen kültürde üreme olmamasına bağladık.

Yalancı pozitif yayma sonuçları genellikle tedavi alan hastalarda görülmektedir. Bu durumda tedavi başarısızlığı, daha az oranda örnekte MOTT basil

varlığı, teknik problemler veya ölü basil atılımı akla gelir. Tedavinin takibinde yayma kullanılıyor olsa bile bu basillerin ölü basil olabileceği akılda tutulmalıdır. (72)

Örnekte bulunan basilin üretilmesi hem canlı basil varlığının saptanmasına hem de tiplendirilmesine olanak sağlar.(28,73) Ancak LJ gibi klasik besiyerlerinde üreme gözlenmesi için 2-4 hafta, Bactec 460TB gibi otomatize sistemlerde üreme gözlenmesi için 7-14 gün süre gerekmektedir. Ayrıca bakterinin tanımlanması için de ek süre gerekmektedir. (73)

Son yıllarda bir çok laboratuvarıda uygulanan moleküler testler zaman açısından ciddi avantaj sağlamakla birlikte, bu yöntemlerin klinik tanıda kullanılabilmesi için standardize edilmeleri gerekmekte, bir kısmı ise yüksek maliyet ve/veya deneyimli personel gerektirmeleri nedeniyle kullanımları kısıtlanmaktadır. Bu yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleri sırasıyla %92-100, % 85-100 arasında değişmektedir. Duyarlılık ve özgüllük örneğin tipine ve yayma pozitif-negatif olmasına göre de değişmektedir. Örneğin solunum yolu örneklerinde ve yayma pozitif örneklerde bir çok moleküler yöntemin duyarlılığı ve özgüllüğü daha yüksek saptanmıştır. (62,69,73)

Tüberküloz laboratuvarlarında fazla sayıda değişik moleküler tanı yöntemleri denenmiş olmakla birlikte, bu yöntemlerin hiç biri henüz mikroskopi ve kültür gibi konvensiyonel yöntemlerin yerini alamamışlardır. Bunun başlıca nedenleri şunlardır : (55,62)

Amplifikasyona dayalı yöntemlerin genel pozitiflik oranlarının ve duyarlılığının kültürden anlamlı derecede yüksek olmayışı. Bu durum; balgam, idrar ve BOS gibi örneklerde bulunan inhibitörlere veya uygun olmayan örnek alma ve işleme koşullarının kullanılmasına bağlıdır. Homojenizasyon ve dekontaminasyon ile örnekteki canlı basillerin %80'inin kaybolabileceği hesaplanmıştır (62). Ayrıca kültür için kullanılan örnek miktarı, genelde, moleküler yöntemler için kullanılan 4-20 kat daha fazladır. Tüberküloz basillerinin küme halinde bir arada bulunma özellikleri göz önüne alındığında, iyice homojenize edilmemiş örneklerde çalışılan hacim azaldıkça duyarlılık da azalmaktadır. (62) Amplikon veya pozitif klinik örneklerin birbirine karışmasına bağlı olarak hatalı pozitiflikler olabilmektedir. (62) Her klinik örnek için kullanılacak, standardize edilmiş ticari kitin henüz

bulunmayışı. Mevcut ticari kitler genelde solunum yolu örnekleriyle çalışılmaya uygundur. (62) Tedavi görmüş olan hastalarda, klinik örnekte ölü basil varlığında bile DNA yöntemleriyle pozitif sonuç alınabileceğinden, tedavinin etkinliğini takip için kültür gerekli olmaktadır. Bir çalışmada altı aylık tedaviden sonra örneklerin tamamında kültür negatif olduğu halde, %25 örnekte SDA ve PZR yöntemleriyle pozitif sonuç alınmıştır. (55,62)

Moleküler yöntemlerin özellikle 7 günden daha az tedavi alan veya son bir yılda anti tüberküloz tedavisi almamış olan hastalarda çalışılması önerilmektedir. Böylece ölü basil varlığına bağlı görülen yalancı pozitifliklerin sorun olmaktan çıkması hedeflenmektedir. RNA'yı hedef alan bir yöntem olan MTBD testi ile çalışmamızdaki tüm örnekleri MTBC varlığı açısından değerlendirdik. RNA'nın dış ortama DNA'dan daha dayanıksız olması nedeniyle RNA'yı hedef alan moleküler testlerde çalışma ortamındaki veya hastadaki ölü basillerin neden olacağı yalancı pozitifliklerin azalacağı düşünülmektedir. (54,55)

MTBD testi ile sadece canlı basillerin saptanabilmesi tedavi alan hastaların takibinde bu testin kullanılabilmesi ihtimalini akla getirmektedir. Biz de bu amaçla hem tedavi alan hem de tedavi almayan hastalardan alınan örnekleri değerlendirerek sonuçlarını kültürle karşılaştırdık. Çalışılan 64 örneğin hiçbirinde MTBC dışında bir mikobakteri varlığı saptanmadı. Tedavi almayan hastalarda MTBD testini standart yöntem olan kültürle kıyasladığımızda duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %97, %100 olarak saptadık. Bu oranlar tedavi alan hastalara baktığımızda %100, %14 olarak değişmektedir. Bu durum testin saptadığı basillerin canlı basil olup olmadığı sorusunu akla getirmektedir. Ancak bunu örnekte belirli sayıda canlı basil varlığında üreme görülebilen kültür yöntemi ile açıklamak uygun olmayabilir. Tedavi alan hastalardaki yalancı pozitiflikler ölü basillerin saptanması ise, test DNA'yı hedef alan diğer moleküler yöntemlere bir üstünlük sağlamayacaktır.

Diğer çalışmalara baktığımızda Luna FFA. ve ark 128 örneği (pulmoner ve diğer) içeren çalışmalarında MTBD testi ile Cobas amplicor MTB'yi karşılaştırmışlar ve MTBD'nin duyarlılığını ve özgüllüğünü sırasıyla %92, %100 olarak tespit etmişlerdir. (74). Weizenegger M ve ark MTBD testini kültür ile karşılaştırdıkları 523 örneği kapsayan bir çalışmada duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %82, %99 olarak bulmuşlardır. (75) Çalışmamızın sonuçlarına bakıldığında diğer

araştırmacıların sonuçları birbirine paralel olarak GenoType Mycobacterium Direkt testinin kültürle kıyaslandığında yüksek bir özgüllükle (%97) tüberküloz infeksiyonlarında iyi bir saptayıcı olabileceği görülmektedir.

Çalışmamızda test edilen 64 örneğin 16'sı (%40) yayma negatif olarak bulunmuştur. Karbolfuksin boyama ile yayma negatif 26 örneğin 12'si (%46) MTBD ile pozitif olarak değerlendirilmiştir Floresan boyama ile 64 örneğin 16'sı (%25) yayma negatif bulunmuştur. Bu 16 rneğin 4' (%25) MTBD ile pozitif bulunmuştur. Bu sonuçlar karşılaştırıldığında, yöntemin yayma negatif vakaların erken tanısında etkin bir rol oynayabileceği düşünülebilir.

Tedavi alan hastalarda yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Tüberküloz olgularının artışına ilave olarak, bu olguların büyük bir çoğunluğunda, tedavide kullanılan primer antitüberküloz ilaçlardan bir veya ikisine yüksek direnç gösteren suşlar etken olmakta, bu da tüberkülozun tedavisinde sorunlar yaratmaktadır. Hastalığın kontrol altına alınması için Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarları araştırmacıları, en kısa süre içinde doğru sonuçlara ulaşmayı hedefleyerek, kullandıkları yöntemleri sürekli iyileştirme çabası içine girmişlerdir.

Tüberküloz basilinin saptanmasının ve kültürde üretilmesinin ardından mikrobiyoloji laboratuvarının en önemli görevi öncelikle tedavide ilk seçenek olan primer ilaçlara karşı duyarlılık testi yapılmasıdır. Önerilen, her hastaya ait ilk izolat için duyarlılık testinin yapılması, iki aylık tedaviye rağmen kültürü pozitif olan hastalarda tekrarlanmasıdır.(60) İlaç direnç testlerinin geleneksel yöntemlerle saptanması, izolasyonda olduğu gibi zahmetli ve zaman alıcıdır. Moleküler yöntemlerle dirençten sorumlu mutasyonların gösterilmesi direnci kanıtlarken, dirençli olduğu saptanan fakat mutasyonların gösterilemediği olgular, dirençten sorumlu başka mutasyonların veya başka mekanizmaları olabileceğini düşündürmektedir. (60,69)

Durmaz R. ve ark 2000 yılında Malatya'da yaptıkları 88 *M. tuberculosis* suşunda primer direnç araştırılmasını içeren çalışmalarında en az bir ilaca direnç %33, çok ilaca direnç %1.1, tek ilaca direnç İNH için %10, RİF için %0 olarak belirlenmiştir.(69) şenol G. ve ark. 2001 yılına ait bir çalışmalarında klasik yöntemle bakılan direnç oranlarına bakıldığında İNH'e toplam direnç %8, RİF'ne

toplam direnç %9 olarak saptanmıştır. Sadece İNH direnci %1.9, sadece RİF direnci ise % 1.7, İNH + RİF direnci %1.6 olarak saptanmıştır.(76)

Biz çalışmamızda 45 örneğin 41'ini RİF'ne duyarlı 4'ünü dirençli (%9) bulduk. 45 örneğin 40'ı İNH'e duyarlıyken 5'i dirençliydi.(% 11). 1 örnekte sadece RİF direnci (%2), sadece İNH direnci 2 örnekte (%4), 3 örnekte de RİF + İNH direnci birlikte (%7) saptandı. Bulduğumuz sonuçlar genel diğer çalışmalarla uyumludur. RİF + İNH direncinin yüksek olmasının(%7) nedeni çalışmamızda tedavi alan hastalardaki 5 üremenin de bulunması ile açıklanabilir. İlaç kullanan hastalarda direncin daha yüksek olduğu, dolayısıyla sekonder direncin yüksek olduğu bilinmektedir. Yolsal N. ve ark. yaptığı 1990-1995 metaanaliz sonuçlarına göre İNH için primer direnç %8.8'ken sekonder direnç %30; RİF için primer direnç %8.9'ken sekonder direnç %31 olarak saptanmıştır.(20)

Brossier F. ve ark.2003-2004 yılları arasında yaptığı 113 *M.tuberculosis* suşunda MTBDR testi ile nükleotid sekans analizi sonuçları karşılaştırılmıştır. Testin duyarlılığı RİF direnci için %100, İNH için %67 olarak bulunmuştur.(77) Hillemann D. ve ark 143 suş ile yaptıkları çalışmalarında sekans analizi ve MTBDR testini kıyaslamışlar. MTBDR'nin duyarlılık ve özgüllüğünü sırasıyla RİF için %99, %100; İNH için %88, %100 olarak bulmuşlardır.(78) Çavuşoğlu ve ark. çalışmalarında testin duyarlılığını sekans analizi ile karşılaştırdıklarında sırasıyla RİF için %95, İNH için %87 olarak tespit etmişlerdir.(79)

Biz çalışmamızda RİF direncini saptamada Bactec 12B ile MTBDR karşılaştırdığımızda duyarlılığı %75, özgüllüğü %100, PPD %75, NPD % 97 olarak belirledik. İNH direncini saptamada Bactec 12B ile MTBDR karşılaştırıldığında duyarlılık %60, özgüllük %100, PPD %100, NPD % 95 olarak belirledik.Sonuçlar değerlendirilirken test ettiğimiz dirençli suş sayısının az olduğu (RİF dirençli 4, İNH dirençli 5) göz önüne alınmalıdır. Yine de çalışmamızın sonuçlarının diğer çalışmalara yakın olduğu görülmektedir. Sonuçlarımız direncin hızlı saptanmasında MTBDR testinin yararlı olabileceğini düşündürmektedir.

6. SONUÇ

Geleneksel tanı yöntemleri olan direkt mikroskopik inceleme ve Löwenstein-Jensen besiyerinde kültür, her basamak laboratuvar koşulunda uygulanabilecek ve kurallarına uygun çalışıldığında oldukça değerli olan yöntemlerdir. Ancak direkt mikroskopik incelemede kullanılan boyama yöntemlerine bakıldığında karbolfuksin boyamanın floresan boyamaya göre duyarlılığının düşük olması; floresan boyamanın ise daha pahalı olması ve floresan mikroskop gerektirmesi kötü yanlarıdır. Klasik kültür sonuçlarının 4-8 hafta gibi uzun sürelerde çıkması, yeni geliştirilen hızlı tanı yöntemlerin rutin uygulamalarda yer almasını zorunlu hale getirmiştir.

Kültüre dayalı hızlı tanı yöntemlerinden olan BACTEC 460 TB sistemi, klinik olumlu hasta örneğinde mikobakterileri üretme oranı ve süresi açısından L-J ile karşılaştırıldığında daha kısa sürede ve yüksek oranda sonuç alınmaktadır. Uygulama sırasında sistemin; laboratuvar iş yükü ve radyoaktivite ihtiva eden atıklarının olması dezavantaj oluşturmasına rağmen, özenle çalışıldığında kontaminasyon oranının düşük olması, mikobakteri üretme oranının yüksek olması ve daha kısa sürede sonuç alınması nedeniyle hızlı tanı amacıyla kullanılabilceği görüşündeyiz.

Uygulaması kolay, duyarlı, 4-6 saatte sonuç verebilen GenoType Mycobacterium Direkt Testin, hızlı sonuç vermesi, yayma negatif örneklerde pozitifliği yakalayabilmesi, uygun koşullarda çalışıldığında duyarlılığının ve özgüllüğünün yüksek olması olumlu özellikleri olarak göze çarpmaktadır. Ancak, diğer moleküler testlerde olduğu gibi laboratuvar çalışması sırasında kontaminasyon nedeniyle yalancı pozitif veya negatif sonuçların görülmesi ve testin çalışılması için özel cihazlar gerekmesi ve testin pahalı oluşu olumsuz yönleri olarak karşımıza çıkmaktadır. Çalışmamızda tedavi almayan hastalarda yalancı pozitifliğe rastlanmamıştır. Ancak tedavi alan hastalarda görülen yalancı pozitifliklerin canlı basil-ölü basil kavramı açısından irdelenmesi gerektiği ve bu konunun yeni araştırmalara konu olabileceği düşünülmektedir.

GenoType MTBDR testinin geleneksel duyarlılık testleri ile kıyaslandığında 4-6 saat gibi bir sürede sonuçlanması, duyarlılığının ve özgüllüğünün yüksek olması (özellikle RİF için) olumlu özellikleri olarak göze çarpmaktadır. Testin çalışılması

için özel cihazların gerekmesi ve testin pahalı oluşu, sadece RİF ve İNH direncinin test edilebilmesi testin olumsuz yönleri olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca testin dirence neden olan bazı mutasyonları saptayamaması (özellikle İNH için) yine testin olumsuzluğu olarak karşımıza çıkmaktadır.

Sonuç olarak, *Mycobacterium tuberculosis*'in hızlı tanısında GenoType Mycobacterium Direkt ve GenoType MTBDR testi, çalışmamızdaki diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında iyi bir potansiyele sahiptir. Ancak bu yeni testler, daha fazla sayıdaki balgam örneği ile değerlendirilmelidir. GenoType Mycobacterium Direkt testinin tedavi alan hastalarda özgüllüğünün düşük olması, örnekte üreme olması için belirli miktarda canlı basil olması gerektiği göz önüne alınarak daha hassas testlerle yapılacak çalışmalarla açıklanabilir. Ayrıca balgam dışı örneklerde yapılacak çalışmalara gereksinim vardır.

11. Ümecik O. Tüberküloz tedavisinin tarihçesi. In: Toraks Derneği İkinci Yıllık Kongresi. 6-10 Mayıs 1998, Antalya Tüberküloz Kursu Notları, Toraks Derneği Tüberküloz Çalışma Grubu, 1998: 1-5.
12. Oktun M. Tüberküloz Tedavisinde Temel İlkeler ve Direnç Sorunu. Klimik Dergisi Cilt 14, Sayı:2 2001, s:71-82.
13. Göçmen A: TB tanı ve tedavi, Katkı Pediatri Dergisi, Ocak-Subat 1992;13(1):64-79
14. Lin HT: The tuberculosis problem and its control in East Asia and the South Pacific Area. Bull Int Union Tuberc Lung Dis 1986; 61:28- 39. 14. İstanbul.
15. Bilgiç H. Tüberküloz epidemiyolojisi. In: Kocabas A, editör. Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü, Adana: Çukurova Üniversitesi Basımevi, 1991:401-37
16. SSBY Verem Savaş Dairesi Başkanlığı. Türkiyede Verem Hastalığının Seyri Üzerinde Araştırma. Ankara 1984/2
17. Bilgiç H. Türkiye’de tüberkülozun durumu ve eradikasyon programı. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu, 11-12 Haziran, 2003 Samsun, Türkiye. s.18-33.
18. Tahaoğlu K, Kizkin O, Karagöz T, Tor M, Partal M, Sadoğlu T. High initial and acquired drug resistance in pulmonary tuberculosis in Turkey. Tuber Lung Dis. 1994;75(5):324-8.
19. Çağlar A, Çiçek AM, Özkan S, Çağlar A. Ankara’da akciğer tüberkülozlu hastalarda ilaç direnci. XXIII. Ulusal Tüberküloz ve Göğüs Hastalıkları Kongresi. 3-5 Nisan 2003, Malatya. s. 90.

30. Baron EJ, Pterson LR, Finegold SM. Mycobacteria. In Shanahan JF, Editör: Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, 9 th Ed., St. Lois, Missoiri, Mosby-Year book, Inc. 1994; 590-633
31. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Mycobacteria. In: Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, eds. *The Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven; 1997:893-952.
32. Sevinç C, Mikobakterilerde virulansın kliniğe yansması..5. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu. 9-11 Aralık 2004.İzmir.s 125-133
33. Kıyan M. Mycobacteriaceae.Temel ve Klinik Mikrobiyoloji.Ed:Ustaçelebi Ş.1999, s:420-454
34. Kocabaş A. Mikobakterilerin Yapısal ve Antijenik Özellikleri. Kocabaş A. Editör. Tüberküloz Kliniği ve Tedavisi.Adana. Çukurova Üniversitesi Basımevi,1991; 47-55
35. Behr MA, Warren SA, Salamon H, et al. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. Lancet 1999; 353:444-449
36. Özkara Ş, Aktaş Z, Özkan S, Ecevit H. Türkiye'de Tüberkülozun Kontrolü İçin Başvuru Kitabı.1.Baskı. Ankara: Rekmay Ltd. Şti. 2003; 12-13
37. Jindani A, Aber VR, Edwards EA, Mitchison DA. The early bactericidal activity of drugs in patients with pulmonary tuberculosis. Am Rev Respir Dis 1980; 121: 939-949
38. Templeton GL, Illing LA, Young L, et al. The risk of transmission of *Mycobacterium tuberculosis* at the bedside and during autopsy. Ann Intern Med 1995; 122:922-925.)

39. Hutton MD, Stead WW, Cauthen GM, Bloch AB, Ewing WM, Nococomial transmission of tuberculosis associated with a draining abscess. J Infect Dis 1990; 161:286-295
40. Dunlap NE, Bass J, Fujiwara P, Hopewell P, Hersburg CR, Salfinger M, Simone PM. Diagnostic standarts and classificationof tuberculosis in adults and children. Am J Respir Crit Care Med 2000; 161: 1376-1395
41. Jensen AP, Lambert LA, Iademarco MD, Ridzon R. Guidelines for Preventing the Transmission Mycobacterium tuberculosis in Health-Care Settings, MMWR Recommadations and Reports. December 30,2005: 1-141
42. Oğuz AV. Tüberküloz basilinin bulaş yolları ve konaktaki seyri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu. 11-12 Haziran 2003. Samsun. Kongre Kitabı, 48-58
43. Özdemir N. Tüberküloz Patogenezi. Özdemir N. Editör: Tüberküloz. Anadolu Solunum Derneği, Eskişehir, Yayın No:1; 45-47
44. Della-Latta P. Digestion-decontamination procedures.In: Isenberg HD (ed). Clinical Microbiology Procedure Handbook.Vol 2, 2nd ed. Washington DC:ASM Pres.2004: 7.1.2.1
45. Palomino J.C. Nonconventional and New Methods in the Diagnosis of Tuberculosis: Feasibility And Applicability İn The Field. İn: Torres A, Caminero J. Eds. Controversial issues in tuberculosis. Eur Respir J 2005;26:339-350
46. Brown BA, Swenson JM, Wallace RJ, Jr. Acid fast Stain Procedures. In Isenberg HD, (ed). Clinical microbiology procedures handbook. ASM Press, Washington DC, 1992; p.3.5.1- 3.5.11
47. Sarıgüzel N. Direkt Mikroskopi Teknikleri Ve Değerlendirilmesi. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu . Samsun. 11-12 Haziran 2003. s:291-298

48. Nancy DE, John B, Paula F, Hopewell P, Horsburgh CR, Salfinger M, Simone PM. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. Am J Respir Crit Care Med. Vol 161.pp 1376-1395, 2000
49. Baylan O, Tüberküloz tanısında kullanılan kültüre dayalı yöntemler. 5. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu, İzmir, 9-11 Aralık 2004, s: 65-72
50. Uzun M. Örneklerin işlenmesi ve kültür yöntemleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu, Samsun, 11-12 Haziran 2003, s: 285-290
51. Benjamin WH, Waites KB, Moser SA. The MB/Bac T is a sensitive method of isolating Mycobacterium tuberculosis from clinical specimens in a laboratory with a low rate of isolation. J Clin Microbiol 2000; 38: 3133-4
52. Haşçelik G. Türkiye’de kullanılan diğer yeni yöntemler. 4. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu 31 Ekim-2 Kasım 2002. Abant. s; 62-65
53. Cheng V.C.C, Yew W.W, Yuen K.Y. Molecular Diagnostics in Tuberculosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2005; 24: 711-720
54. Durmaz R, Günal S. Tüberküloz tanısında polimeraz zincir reaksiyonunun kullanılması. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji .Malatya. Ed:Durmaz R.s;173-181
55. Özyurt M. Moleküler tanıda ticari sistemler, DNA Strip teknolojisinin ‘Line Probe assay’ kullanımı. IV. Tüberküloz Sempozyumu .8-11 Aralık.Malatya.s.224-240
56. Weizenegger M, Hengstler M, Feldmann K, Fahr AM,. Direct detection of Mycobacterium tuberculosis complexes and four nontuberculous mycobacteria : Preliminary data of an evaluation in a hospital and a private laboratory . 25.th Annual Congress of The ESM, Italy, 27-30 June 2004.

57. Trapp RG, Dawson-Saunders B. Basic& Clinical Biostatistics. Appleton&Lange, connecticut, USA, 2^{sd} ed. 1998; 232-249
58. Çilli A. Antitüberküloz ilaçlar ve etki mekanizmaları.Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları (KLİMİK) Derneği . Sempozyum Kitabı.s;163-164.
59. World Health Organization: Anti-tuberculosis drug resistance in the world, Third Global Report. The WHO/IUATLD Global Project on anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance 1999-2002,WHO (2005).
60. Durmaz R. *Mycobacterium tuberculosis*'de Direnç Sorunu.ANKEM Dergisi 2005; 19(2):107-110
61. Durmaz R, Ozerol IH, Durmaz B, Gunal S, Senoglu A, Evliyaoglu E: Primary drug resistance and molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in a population with high tuberculosis incidence in Turkey, Microb Drug Resist 2003;9(4):361-6
62. R.Durmaz.Tüberküloz laboratuvarında moleküler yöntemler.www.verem.org.tr
63. Cooksey RC, Morlock GP, Glickman S, Crawford JT. Evaluation of a Line probe assay kit for characterization of *rpoB* mutation in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from New York city. J Clin Microbiol 1997; 35: 1281-1283
64. Torres MJ, Criado A, Palomares JC, Aznar J. Use of real-time PCR and flourometry for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance-associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2000; 38: 3194-3199
65. Lee LV. Procedures for identification from culture; conventional biochemicals. In Isenberg HD (ed): Clinical Microbiology Procedure Handbook. Washington DC, American Society for Microbiology, 2004; p: 7.6.11-7.6.1.12

66. Siddiqi S. Procedures for identification from culture; BACTEC NAP Test. In Isenberg HD (ed): Clinical Microbiology Procedure Handbook. Washington DC, American Society for Microbiology, 2004, p: 7.6.3.1-7.6.3.3.
67. Center for Disease Control: Initial therapy for tuberculosis era of multiagent resistance: recommendations of Advisory Council for the elimination of tuberculosis, MMWR 1993;42(R-7):1-3
68. Aslan G, Delialioğlu N, Emekdaş G, Otağ F, Yıldız Ç, Çalıkoğlu M , Özdemir Ö. *Mycobacterium Tuberculosis* Suşlarının izoniazid, Rifampisin, Streptomisin ve Etambutol Duyarlılıklarının BACTEC Yöntemi ile Belirlenmesi. ANKEM Derg 2005;19(1) s:43-47
69. Esen N, Tanı Ve İlaç Duyarlılık Testlerinde Moleküler Yöntemlerin Değeri.21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu .Samsun.s:403-408
70. Albay A, Kısa O, Baylan O, Doğancı L,. The evaluation of FastPlaque TB test for The rapid diagnosis of tuberculosis. Diag Microbiol and Infect Dis 2003;46(3): 211-215
71. Tarhan G, Ordulu L, Gümüşlü F, Ceyhan I, Cesur S. Comparison of auramine-rhodamine and Erlich-Ziehl-Neelsen staining methods for the diagnosis of tuberculosis. 2003 Apr-Jun;37(2-3):131-6
72. Öztop A, Ünsal İ, Aktoğu S, Güneri S ve ark. Tüberküloz Tedavisi Sırasında Yayma Pozitifliği ile Birlikte Kültür Negatifliği Gösteren bir Olgu:Ölü Basil Kavramının İrdelenmesi. Klimik Dergisi.2003.16;3 s:130-133
73. Singh P, Kant L, Shah B, Muthuswamy V, Saxena NC. What is New in the Diagnosis of Tuberculosis. Medappa N;Ed. ICMR Bulletin.August, 2002. 32,8

74. Luna FFA,Ruiz P, Gutierrez J,Casal M.Evaluation of the GenoType Mycobacteria Direct Assay for Detection M.tuberculosis complex in Clinical Samples. Jour of Clin Microbiology.Aug 2006.p:3025-3027
75. Weizenegger M, Hengstler M, Feldmann K, Fahr A.M. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and four nontuberculous mycobacteria: Preliminary data of an evaluation in a hospital and a private laboratory.Annual Congress of EM.27-30 July.Italy
76. Şenol G, Kömürcüoğlu B, Kömürcüoğlu A. M.tüberküloz kökenlerinin antitüberküloz ilaçlara direnç durumu.İnfeksiyon dergisi 2004;18(4):441-445
77. Brossier F, Veziris N, et al.Performance of the GenoType MTBDR Line Probe Assay for Detection of Resistance to Rifampin and İsoniasid in Strains of M.tuberculosis . Jour of Clin Microbiology, Oct.2006, p,3659-3664
- 78.Hillemann D, Weizenegger M, Kubica T, Richter E, Niemann S. Use of the Genotype MTBDR Assay for Rapid Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex Isolates. Jour Of Clin Microbiology, Aug. 2005, p. 3699–3703
- 79.Cavuşoğlu C, Turhan A, Akıncı P, Söyler İ. Evaluation of the GenoType MTBDR Assay for Rapid Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance in M.tuberculosis Isolates. Jour Of Clin Microbiology, July 2006, p.2338-2342.

